



Sofia Rosária Frazão Cuvaneiro Fróis de Figueiredo

Processo de extração de polpa de medronho coadjuvado pela ação de enzimas carboidrases

Orientador: Ivo Manuel Mira Rodrigues

Coimbra, 2017

Sofia Rosária Frazão Couvaneiro Fróis de Figueiredo

Processo de extração de polpa de medronho coadjuvado pela ação de enzimas carboidrases

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de mestre em ENGENHARIA ALIMENTAR

Orientador: Ivo Manuel Mira Rodrigues

Coimbra, 2017

Resumo

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é um arbusto da família *Ericaceae*. Mede até 5 metros e tolera diferentes condições climáticas, desde a seca às baixas temperaturas (até -12 °C). Pode ser encontrado tanto em solos calcários como siliciosos. Encontra-se largamente distribuído ao longo da bacia do Mediterrâneo. Dos frutos produzem-se aguardente de medronho ou compotas. É atualmente reconhecida como sendo uma espécie com grande potencial, cada vez mais desejada por agricultores que procuram novas formas de rendimento ou que foram afetados pela elevada incidência de incêndios florestais. O presente trabalho é um primeiro contributo para o estudo de técnicas de extração da polpa através da aplicação de enzimas. Foram testadas duas enzimas, Viscozyme® L e Pectinex®, em várias condições de i) temperatura (20-25 °C e 45 °C); de ii) concentração (1, 2 e 4 µL/g de fruto macerado) e de iii) tempo de incubação (30 e 60 minutos). Verificou-se também o efeito destas enzimas em várias características físico-químicas da polpa de medronho (rendimento de extração, cor, acidez titulável, pH, sólidos totais, sólidos insolúveis, sólidos solúveis e viscosidade).

A Viscozyme ® L é mais eficaz na diminuição da viscosidade aparente das polpas extraídas, enquanto a Pectinex® proporciona um maior rendimento de extração de polpa a partir do medronho acompanhado também do aumento do °Brix da polpa extraída. A polpa com menor viscosidade ($0,88 \pm 0,38$ Pa.s) foi obtida quando aplicada a Viscozyme ® L à temperatura de 45 °C durante 30 minutos, na concentração de 4 µL/g. O rendimento de extração mais elevado ($54,9 \pm 1,1\%$) foi obtido quando aplicada a Pectinex® na concentração de 2 µL/g, à temperatura de 45 °C durante 30 minutos, enquanto o maior °Brix ($27,3 \pm 0,1$) foi observado à temperatura ambiente, durante 30 minutos na concentração de 4 µL/g. No entanto, para as restantes características físico-químicas estudadas tais como a acidez titulável, extrato seco e cor, não foram encontradas diferenças significativas. As polpas de 2ª extração são caracterizadas pela diminuição do °Brix de 26-27 para 15-16, ainda assim muito superior ao °Brix apresentado por muitos frutos com relevância na indústria alimentar, como a laranja, maçã, pêra, pêssego ou ananás. Estas polpas caracteriza-se ainda por cores mais escuras e avermelhadas.

A utilização desta metodologia na extração de polpa de medronho permitiu a produção de dois produtos distintos, com potencial de utilização em variados sectores da indústria alimentar, como a indústria de sumos e refrigerantes, lacticínios, bebidas alcoólicas, etc.

Os resultados deste estudo permitem aumentar a variedade de produtos derivados do medronho como mais-valia para esta fileira e para indústria alimentar.

Palavras-chaves: *Arbutus unedo*, medronho, rendimento de extração, viscosidade, polpa, Viscozyme® L, Pectinex®

Abstract

The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) is a bush of the Ericaceae family. It measures up to 5 meters and tolerates different climatic conditions, from dry to low temperatures (up to -12 °C). It can be found in both limestone and siliceous soils. It is widely distributed throughout the Mediterranean basin. From the fruits are produced spirit or jams. It is currently recognized as a species with great potential, increasingly desired by farmers seeking new forms of income or who have been affected by the high rate of forest fires. The present work is an initial contribution to the study of pulp extraction techniques through the application of enzymes. Two enzymes, Viscozyme® L and Pectinex®, were tested under various conditions i) temperature (20/25 °C and 45 °C); ii) concentration (1, 2 and 4 µL per g of macerated fruit), and iii) incubation time (30 and 60 minutes). The effect of these enzymes on several physicochemical characteristics of the pulp was also verified (extraction yield, color, titratable acidity, pH, total solids, insoluble solids, soluble solids and viscosity).

Viscozyme ® L is more effective in decreasing the apparent viscosity of pulps, while Pectinex ® is what motivates the highest increase in pulp extraction yield from the fruit accompanied by the increase of the °Brix of the extracted pulp. The pulp with the lowest viscosity (0.88 ± 0.38 Pa.s) was obtained when applied to Viscozyme ® L at 45 °C for 30 minutes at the concentration of 4 µL/g. The highest extraction yield ($54.9 \pm 1.1\%$) was obtained when applied to Pectinex® at a concentration of 2 µL/g, at a temperature of 45 °C for 30 minutes, while the highest Brix ($27.3 \pm 0.1\%$) was observed at room temperature for 30 minutes at the concentration of 4 µL/g. However, for the remaining physicochemical characteristics studied (titratable acidity, dry extract and color), no significant differences were found. The pulps of 2nd extraction are characterized by the decrease of °Brix 26-27 to 15-16, yet much higher than the °Brix presented by many fruits with relevance in the food industry, such as orange, apple, pear, peach or pineapple. It is also characterized by darker and reddish colors.

The use of this methodology in the extraction of pulp provides an increase in pulp (and soluble solids) extraction yield with the production of 2 distinct products, with potential for use in various sectors of the food industry, such as juices and soft drinks, dairy products, alcoholic beverages, etc.

The results of this study allow to increase the variety of products derived from strawberry tree as an added value for this row and for the food industry.

Keywords: *Arbutus unedo*, strawberry tree, extract yield, viscosity, pulp, Viscozyme® L., Pectinex®

Agradecimentos

Agradeço a todos os que tornaram possível, de uma forma ou de outra, a execução desta dissertação.

Primeiro que tudo, quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Ivo Rodrigues, pelos ensinamentos, críticas e sugestões, bem como pelo enorme apoio, compreensão e, claro, orientação e, ao Sr. Viegas pelo tempo despendido e ajuda prestada em laboratório.

Em especial, ao meu Pai e à minha Mãe, que me apoiaram e “lutaram” comigo para que conseguisse concluir mais uma etapa da minha vida. A eles devo tudo o que sou e tudo o que consegui até hoje. Foram cruciais para o meu desenvolvimento como pessoa e aluna. Muito obrigado por todo o amor e carinho e, por estarem sempre comigo.

E por fim mas não por último, João obrigada por caminhares sempre comigo.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado por:

- Fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., e cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Acordo de Parceria Portugal 2020 - Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO 2020), no âmbito do projeto CENTRO-01-0145-FEDER-023631 SoSValor: Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal,

- e pelo Projeto PRODER - Melhoramento da espécie e a valorização do Medronheiro - Medida 4.1, Cooperação para a Inovação, Ref.^a 53106.

Índice

Resumo	i
Abstract.....	iii
Agradecimentos	v
Financiamento	vi
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas	ix
1. Enquadramento e motivação.....	1
2. Introdução	2
2.1. <i>Arbutus</i>	2
2.1.1. Taxonomia	2
2.1.2. Descrição Botânica.....	2
2.1.3. Distribuição Geográfica	3
2.1.4. Importância ecológica	4
2.1.5. Importância Económica e Etnobotânica do fruto.....	5
2.2. Enzimas	10
2.2.1. Propriedades gerais	10
2.2.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática	11
2.3. Enzimas carboidrases	11
2.3.1. Viscozyme® L	13
2.3.2. Pectinex®	14
3. Materiais e métodos	15
3.1. Matéria-prima	15
3.2. Rendimento de extração e características físico-químicas dos produtos obtidos (polpas de 1ª e de 2ª extração).....	17
3.2.1. Rendimento de extração	18
3.2.2. Cor.....	18
3.2.3. Acidez titulável	18

3.2.4.	pH.....	19
3.2.5.	Sólidos totais.....	19
3.2.6.	Sólidos insolúveis	20
3.2.7.	Sólidos solúveis	20
3.2.8.	Reologia da polpa de medronho	20
3.2.9.	Análises estatísticas.....	21
4.	Resultados e discussão	22
4.1.	Caracterização dos medronhos (pasta macerada de medronho)	22
4.2.	Caracterização físico-químicas da polpa de 1 ^a extração	22
4.2.1.	Rendimento de extração (%)	22
4.2.2.	°Brix.....	24
4.2.3.	Viscosidade aparente.....	26
4.2.4.	Cor.....	29
4.2.5.	pH e acidez titulável da polpa de 1 ^a extração	30
4.3.	Caracterização físico-química da polpa de 2 ^a extração (extraída após lavagem do bagaço resultante da 1 ^a extração).....	32
4.3.1.	°Brix.....	32
4.3.2.	Cor.....	33
4.3.3.	pH e acidez titulável da polpa de 2 ^a extração	35
5.	Conclusões e perspectivas futuras	36
	Referências bibliográficas	38
	Anexos	46
	Anexo I.....	46
	Anexo II	47

Índice de figuras

Figura 1 - <i>Arbutus unedo</i> L. (A) Ramos com folhas jovens (B) e frutos (Julho) (C) Conjunto de flores em desenvolvimento (Janeiro). (D,E) Frutos maduros e respetiva polpa (Novembro) (F) Frutos em diferentes estados de maturação em simultâneo na mesma árvore.....	3
Figura 2- (A) Distribuição de <i>Arbutus unedo</i> na Bacia Mediterrânica e Costa Atlântica (B) Pormenor da distribuição na Península Ibérica.....	4
Figura 3 - Metodologia de extração de polpa de medronho coadjuvado pela ação de enzimas carboidrases	16
Figura 4 - Rendimento de extração de polpa (%) (1ª extração) com a aplicação da Viscozyme® L	23
Figura 5 - Rendimento de extração de polpa (%) (1ª extração) com a aplicação da Pectinex®.....	24
Figura 6 - °Brix na polpa de 1ª extração com aplicação da Viscozyme® L.....	25
Figura 7 - °Brix na polpa de 1ª extração com aplicação da Pectinex®	25
Figura 8 – Viscosidade aparente na polpa de 1ª extração com aplicação da Viscozyme®	26
Figura 9 – Viscosidade aparente na polpa de 1ª extração com aplicação da Pectinex®.....	27
Figura 10- Cor na polpa de 1ª extração com aplicação da Viscozyme® L	29
Figura 11- Cor na polpa de 1ª extração com aplicação da Pectinex®	29
Figura 12 – °Brix na polpa de 2ª extração com aplicação da Viscozyme® L	32
Figura 13 - °Brix na polpa de 2ª extração com aplicação da Pectinex®	33
Figura 14 – Cor na polpa de 2ª extração com aplicação da Viscozyme® L	34
Figura 15 – Cor na polpa de 2ª extração com aplicação da Pectinex®	34

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição nutricional do fruto de <i>A. unedo</i> , segundo vários autores por ordem cronológica.....	7
Tabela 2 - Condições de aplicação das enzimas Viscozyme® L. e Pectinex® à pasta de medronho macerado	17
Tabela 3 - Caracterização do medronho	22
Tabela 4 - Tixotropia, índice de consistência (k) e fator da lei de potência (n) do Modelo de Oswald da polpa de 1ª extração.....	28

Tabela 5 – pH, acidez titulável e extrato seco das polpas de 1ª extração	31
Tabela 6 – pH e acidez titulável da polpa de 2ª extração	35

1. Enquadramento e motivação

O medronho tem despertado um interesse crescente na zona centro e sul do país visto ser uma espécie autóctone, rústica, adaptada a solos degradados, a condições de stress hídrico e utilizada em faixas de proteção (linhas de água e na defesa da floresta contra incêndios - DFCI).

Esta dissertação enquadra-se na valorização económica de um produto subestimado e apresenta um estudo contributivo para o aumento do rendimento de extração de polpa de medronho com diminuição aparente da sua viscosidade. A concretização deste objetivo levará à produção de uma nova categoria de produtos alimentares derivados do medronho, de características composicionais idênticas às do fruto em natureza, isentos de sementes e esclereídeos. Estes produtos, por sua vez, terão potencial de utilização nos mais variados setores da indústria alimentar, tais como a produção de bebidas à base de fruta, doces, pastelaria, gelados, iogurtes, entre outros.

Neste contexto fomenta-se a valorização de um recurso endógeno com potencial para o desenvolvimento regional (criação de emprego, fixação de populações e exportação). Acresce ainda que os consumidores estão cada vez mais recetivos a novos produtos alimentares com características diferenciadoras, oriundos de matérias-primas endógenas e tradicionalmente pouco utilizadas na dieta alimentar.

2. Introdução

2.1. *Arbutus*

2.1.1. Taxonomia

O género *Arbutus* pertence à classe *Magnoliopsida*, ordem *Ericales*, família *Ericaceae* e subfamília *Arbutoideae*. Este é um grupo dentro da família *Ericaceae*, que se distingue, não só pela morfologia das flores e frutos como também pela anatomia e características fitoquímicas. Este género destaca-se pelas características dos seus frutos e pela produção de compostos fenólicos com grande importância económica (Sá *et al.*, 2011; Takrouni *et al.*, 2012). Na região mediterrânica ocorrem três espécies: *A. Unedo*, *A. Andrachne* e *A. Andrachnoides*. A última é possivelmente um híbrido entre *A. Unedo* e *A. Andrachne* (Hileman *et al.*, 2001).

O medronheiro é uma das poucas plantas que conseguiram suportar os períodos de frio do Quaternário, adaptando-se ao clima mediterrânico (Silva, 2007).

2.1.2. Descrição Botânica

O medronheiro possui porte arbustivo ou arbóreo, com uma altura entre 1,5 e 3 metros, apesar de, ocasionalmente atingir 12 metros. A sua copa, sempre verde, torna-o uma excelente planta ornamental. É capaz de suportar baixas temperaturas (até -12 °C) (Mereti *et al.*, 2002) e é tolerante à seca (Gomes & Canhoto, 2009). As folhas (Figura 1A e B) são persistentes, simples, alternas, pecioladas, oblonga-lanceoladas, geralmente serradas, de cor verde-claro quando jovens e verde-escuro intenso quando adultas. Ambas as epidermes consistem de uma camada de células com paredes muito espessas, cobertas por uma cutícula densa. O mesófilo é constituído por duas camadas de células em paliçada, na página adaxial, muito regulares, e por parênquima esponjoso, caracterizado por grandes lacunas, na página abaxial. As folhas são muito ricas em compostos fenólicos (Rotondi *et al.*, 2003). Geralmente, as folhas são glabras quando adultas, embora algumas espécies, como *A. Unedo* possuam pêlos glandulares nos pecíolos (Sorensen, 1987). As flores (Figura 1C) são hermafroditas e têm forma de campânula, dispondo-se em panículas pendentes. A corola é urceolada, com cinco pétalas esbranquiçadas ou ligeiramente rosadas. O fruto (Figura 1D) é o medronho, uma baga esférica com 2-3 cm de diâmetro, vermelho escuro quando maduro, com polpa amarelada (Figura 1E) e várias

pequenas sementes de tegumento castanho. Demora cerca de um ano a amadurecer, sendo possível encontrar, na mesma árvore, simultaneamente flores e frutos (Figura 1F).

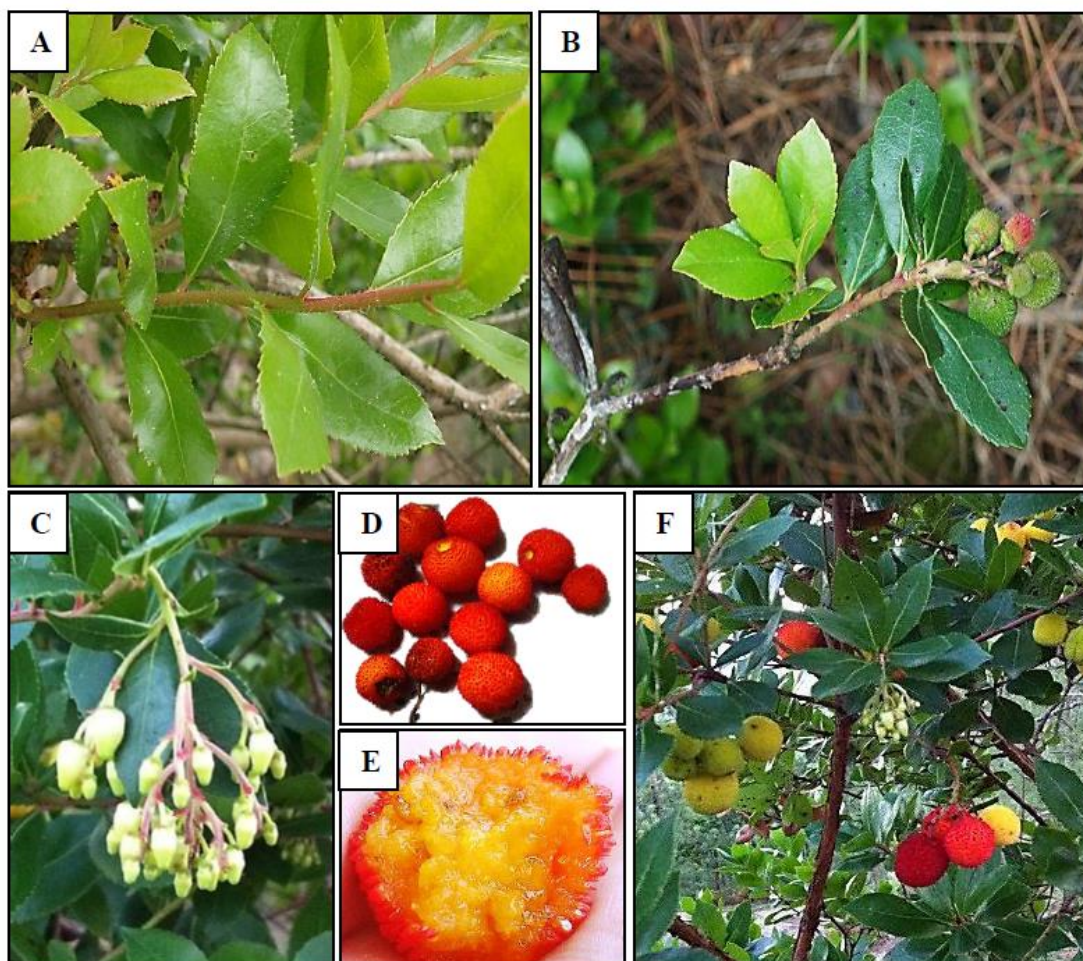


Figura 1 - *Arbutus unedo* L. (A) Ramos com folhas jovens (B) e frutos (Julho) (C) Conjunto de flores em desenvolvimento (Janeiro). (D,E) Frutos maduros e respetiva polpa (Novembro) (F) Frutos em diferentes estados de maturação em simultâneo na mesma árvore (Fonte: Dias, 2014)

2.1.3. Distribuição Geográfica

Arbutus Unedo L. é uma espécie nativa da Região Mediterrânica e Europa Ocidental, podendo ainda encontrar-se na Irlanda, no Oeste da França e no Norte de África (Figura 2), onde cresce espontaneamente em vários países, nomeadamente em zonas rochosas e em solos bem drenados (Torres *et al.*, 2002; Gomes & Canhoto, 2009). Esta espécie cresce tanto em solos ácidos como calcários (pH 5,0-7,2), preferindo substratos siliciosos ou descarbonificados e ocorrendo, por vezes, até aos 1200 m de altitude (Mereti *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002; Godinho-Ferreira *et al.*, 2005; Celikel *et al.*, 2008; Ertekin & Kirdar, 2010).

Em Portugal, encontra-se maioritariamente a Sul do Rio Tejo, na região das Serras do Caldeirão e Monchique (Algarve), podendo, contudo, encontrar-se difundido por todo o país, incluindo Trás-os-Montes (Pedro, 1994), onde cresce associado a comunidades arbustivas (Prada & Arizpe, 2008). Deste modo, é uma espécie com ampla distribuição, desde áreas de clima Atlântico, no Norte, até áreas secas e áridas no Sul, ocupando cerca de 15.500 ha (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005).

O medronheiro foi uma das poucas espécies que conseguiu sobreviver aos períodos de frio do Quaternário, razão pela qual se adaptou ao clima mediterrânico, tendo, por isso, colonizado vários habitats (Silva, 2007). Esta adaptação é particularmente visível ao nível das folhas, muito embora a atividade fotossintética da planta e a eficiência do uso da água sejam muito reduzidas durante o período de seca (Tenhunen *et al.*, 1982; Gratani & Ghia, 2002).

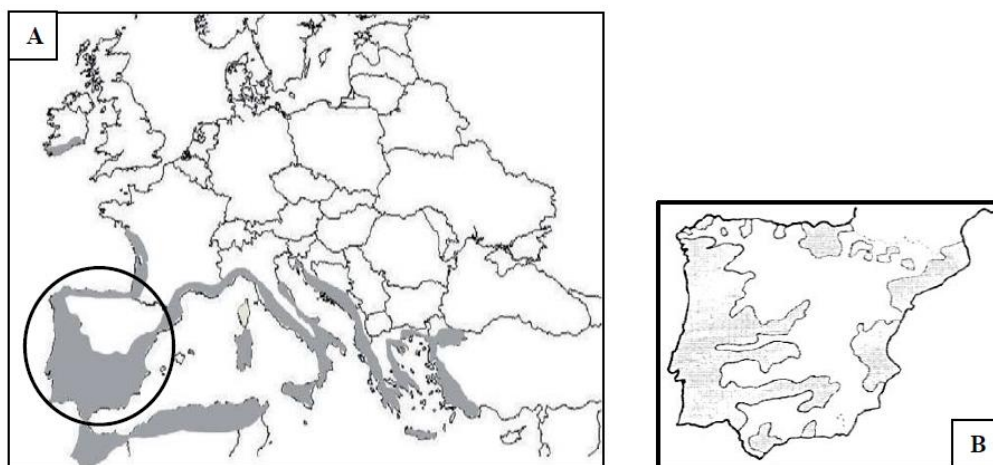


Figura 2- (A) Distribuição de *Arbutus unedo* na Bacia Mediterrânica e Costa Atlântica (adaptado de Oliveira *et al.*, 2011) (B) Pormenor da distribuição na Península Ibérica (adaptado de Torres *et al.*, 2002)

2.1.4. Importância ecológica

O medronheiro, pela sua fisionomia e características adaptativas, é uma espécie que se mostra bastante resistente à seca e possui uma grande capacidade de regeneração após incêndios, criando vários rebentos por toixa, numa regeneração vigorosa (Quevedo *et al.*, 2013). Estas características contribuem bastante para a resiliência dos ecossistemas onde esta espécie está inserida (Vasques *et al.*, 2013). É, por isso, uma espécie interessante para programas de florestação na região mediterrânica, nomeadamente na colonização de solos marginais e na prevenção da propagação de incêndios florestais

(Gomes *et al.*, 2014). Além disso apresenta grande importância ecológica por evitar a erosão dos solos, pela água e ar, e por manter a biodiversidade (Lopes *et al.*, 2012; Takrouni *et al.*, 2012, Abreu *et al.*, 2014).

2.1.5. Importância Económica e Etnobotânica do fruto

O medronheiro é considerado uma espécie NUC, o que significa que possui interesse agrícola, nomeadamente para as populações residentes no local de origem, mas por várias razões não é devidamente explorado em termos agrícolas (GFU, 2013; Gomes *et al.*, 2010). Apesar disso, o medronheiro é um dos mais importantes e conhecidos arbustos da bacia mediterrânica, pela sua importância como planta ornamental, melífera, medicinal e pela utilização dos seus frutos e madeira (Silva, 2007). É uma espécie multifuncional, usada em farmacêutica, cosmética, saúde ou alimentação, como fonte de compostos funcionais e ainda como fonte de fibra (GFU, 2013). Os frutos, medronhos, são comestíveis e podem ser consumidos frescos ou preparados em compotas ou geleias. Podem também ser fermentados e destilados para obtenção de bebidas alcoólicas, algumas com elevado teor de etanol 45-50% (v/v) (Santo *et al.*, 2012), sendo este o seu uso mais expressivo na atualidade (Gomes *et al.*, 2010). Na produção de 1 litro de aguardente, são usados cerca de 10 quilos de medronhos frescos (Gomes & Canhoto, 2009). Guerreiro *et al.*, (2013) com alguns estudos a nível do armazenamento de medronhos frescos concluíram que, a uma temperatura de 0 °C, estes mantêm a cor e o sabor praticamente inalterados durante, pelo menos, 15 dias. Este é um passo importante para a comercialização do fruto nas grandes superfícies comerciais, contornando a sua rápida degradação quando completamente maduro, contribuindo também para a valorização do medronheiro como espécie frutícola de interesse.

A composição dos frutos é melhor conhecida que a composição das folhas nesta espécie (Oliveira *et al.*, 2009). Os frutos contêm uma percentagem elevada de açúcares, entre os 42 e 52% (base seca), e são uma boa fonte de minerais, especialmente de potássio, cálcio e fósforo (Özcan & Haciseferoğulları, 2007). São uma boa fonte de antioxidantes, incluindo compostos fenólicos (antocianinas e outros flavonóides, derivados do ácido gálico e taninos), vitaminas C e E, e carotenóides (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2013). Muitas das funções biológicas atribuídas ao consumo de medronhos estão relacionadas com a sua composição nestes

compostos antioxidantes (Oliveira *et al.*, 2011a). Na sabedoria popular os frutos são considerados ricos em etanol, assim sendo, quando comidos em grande quantidade podem causar a sensação de embriaguez (Abreu, 2014). É essa a possível origem do restritivo específico “*Unedo*” de “*unus + edo*” que significa “comer apenas um” (Cela *et al.*, 2003). No entanto, Oliveira *et al.* (2011b) por análise dos compostos voláteis em medronhos, em vários estados de maturação, verificaram que apesar dos álcoois serem o composto maioritário, nenhum etanol é detetado. Outros usos têm sido explorados para estes frutos, tais como: iogurte, tartes, bolos, barras de cereais ou cereais para pequeno-almoço (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001), incorporados como polpa, frutos frescos, secos ou desidratados. Dado o seu elevado teor de β -caroteno e antocianinas, os medronhos podem também ser usados para produção de corantes alimentares (Molina *et al.*, 2011). Na tabela 1 podemos verificar a composição nutricional do fruto segundo vários autores.

Tabela 1 - Composição nutricional do fruto de *A. unedo*, segundo vários autores por ordem cronológica (adaptado de: Anastácio, 2014)

			Noronha	Cavaco		Özcan & Haciseferoğullari*	Celikel <i>et al.</i> ,	Şerçe <i>et al.</i> ,	Barros <i>et al.</i> , *	Orak <i>et al.</i> ,	Sulusoglu <i>et al.</i> ,	Ruiz-Rodríguez <i>et al.</i> ,	Pimpão <i>et al.</i> ,		
			2001	2007		2007	2008	2010	2010	2011	2011	2011		2013	
			Origem	Arganil	Algarve		Turquia	Turquia	Turquia	Trás-os-Montes	Turquia	Turquia			Alentejo
			Unidades	média	méd ± DP	min - máx	méd ± DP	min - máx	méd ± DP	méd ± DP	méd ± DP	min - máx	média	min - máx	méd ± DP
	Teor de humidade	g/100 g	74,6	68,84 ± 10,32	58,92 - 73,96	53,72 ± 2,1			59,7 ± 2,67	56,16 ± 1,07		56,48	46,82-71,89		
	Energia	kcal/100 g	76,1			151,34 ± 6,02			161,2 ± 0,47			101	61,48 - 135,93		
	Proteínas	g/100g	1,2	0,98 ± 0,032		1,56± 0,56			1,25 ± 0,03			0,899	0,581-1,187		
	Lípidos	g/100g										0,609	0,299-0,779		
	Hidratos de carbono	g/100g							37,81 ± 0,17			23,55	14,11-31,55		
	TSS	(°Brix)		22,71 ± 3,179	18,25 -		15 - 30	11,9 ± 0,1			16,5 - 31,68			27,8 ± 0,1	
	Gordura	g/100g	0,5						0,55 ± 0,16						
Açúcares	Frutose	g/100g	10,7	3,07 ± 1,152	1,83 - 4,33			9,75 ± 1,29	9,76 ± 0,59			10,36	3,64 - 14,54		
	Glucose	g/100g	5,1	1,11 ± 0,399	0,7-1,53			5,33 ± 0,88	4,89 ± 0,10			5,51	2,34-6,49		
	Sacarose	g/100g	n.d.	0,12 ± 0,046	0,1-0,15			1,29 ± 0,57	1,69 ± 0,02			0,412	traces - 0,483		
	Fibra total	g/100g										16,21	10,04-22,27		
Fibras	Fibra solúvel	g/100g										2,95	2,17-3,71		
	Fibra insolúvel	g/100g										13,26	7,86 - 18,55		
	Celulose	g/100g	3,2			2,96± 0,51									
	Cinza	g/100g	0,8			1,31± 0,06			0,69 ± 0,04			0,864	0,685-1,058		
	pH		3,9	3,72	3,19 - 4,73	4,6± 0,1		5,57 ± 0,07			3,52 - 3,7	3,38	3,2-3,5		
Ac. Orgânicos	Acidez titulável	% eq. Ác.málico					0,66 - 1,59	0,67 ± 0,17			0,48 - 1,24				
	Ácido málico	mg/100 g						180				254,9	203,3-299,6		
	Ácido oxálico	mg/100 g		n.d.								96,51	48,44 - 146,75		
	Ácido cítrico	mg/100 g						20							
	Ácido fumárico	mg/100 g										0,729	0,489-1,114		

Tabela 1 – Composição nutricional do fruto de *A. unedo*, segundo vários autores por ordem cronológica (continuação) (adaptado de: Anastácio, 2014)

		Origem	Noronha	Cavaco		Özcan & Haciseferoğlu*	Celikel <i>et al.</i> ,	Şerçe <i>et al.</i> ,	Barros <i>et al.</i> , *	Orak <i>et al.</i> ,	Sulusoglu <i>et al.</i> ,	Ruiz-Rodríguez <i>et al.</i> ,	Pimpão <i>et al.</i> ,
			2001	2007		2007	2008	2010	2010	2011	2011	2011	2013
			Arganil	Algarve		Turquia	Turquia	Turquia	Trás-os-Montes	Turquia	Turquia		Alentejo
			Unidades	média	méd ± DP	min - máx	méd ± DP	min - máx	méd ± DP	méd ± DP	méd ± DP	min - máx	méd ± DP
Sais minerais	Ca	mg/100 g		48,55		229,5 ± 6,94		187 ± 13		64,55 ± 9,1		66,54	40,54 - 104,12
	Cu	mg/100 g				0,08± 0,02		0,17 ± 0,04		1,2		0,125	0,073-0,208
	Fe	mg/100 g				0,56± 0,05		4,65 ± 0,8		0,68		0,885	0,354-1,856
	K	mg/100 g		36,16		689,99 ± 78,07		881 ± 63		293,15 ± 46,7		177,3	79,72 - 323,14
	P	mg/100 g				169,78 ± 15,72		179 ± 37		49,3 ± 7,0			
	Mg	mg/100 g		9,62		60,88 ± 5,98		124 ± 7				19,62	9,56 - 45,85
	Mn	mg/100 g				0,21± 0,03		0,42				0,081	0,038-0,178
	S	mg/100 g								17,14			
	Al	mg/100 g				0,93± 0,12							
	As	mg/100 g				0,49 ± 0,3							
	B	mg/100 g				0,74 ± 0,1				1,8			
	Cd	mg/100 g				0,009± 0,002							
	Cr	mg/100 g				0,11± 0,04							
	Ga	mg/100 g				0,02± 0,02							
	Li	mg/100 g				0,04 ± 0,007							
	Na	mg/100 g		29,74		32,45 ± 3,7						7,52	4,33-9,94
	Ni	mg/100 g				0,006± 0,006							
	Pb	mg/100 g				0,02 ± 0,002							
	Sr	mg/100 g				0,24± 0,04							
	Ti	mg/100 g				0,007 ± 0,01							
	V	mg/100 g				0,77 ± 0,2							
	Zn	mg/100 g				0,39± 0,04		0,88 ± 0,1		1,8		0,471	0,188-0,762

Os medronhos têm sido usados na medicina tradicional como antissépticos, diuréticos e laxativos, enquanto as folhas têm sido largamente usadas como adstringentes, diuréticas, agentes antissépticos urinários e, como terapia para a hipertensão arterial, arteriosclerose, trombose e diabetes (Ziyyat & Boussairi, 1998; Pallauf *et al.*, 2008; Fortalezas *et al.*, 2010). Estudos sobre propriedades antimicrobianas foram também realizados por Ferreira *et al.* (2012) mostrando a inibição de bactérias Gram-positivas responsáveis por doenças como, por exemplo, a pneumonia.

As folhas de medronheiro podem ser usadas para obtenção de extratos benéficos a nível nutricional e medicinal, como fonte de antioxidantes naturais, para suplementos alimentares, reduzindo o recurso a suplementos sintéticos e aditivos potencialmente tóxicos (Malheiro *et al.*, 2012). Para além disso, os extratos das folhas podem também ser usados como ingrediente funcional em carne processada prevenindo a oxidação de lípidos (Morales *et al.*, 2013).

Também a madeira desta pequena árvore possui compostos com interesse medicinal (Cela *et al.*, 2003), para além disso é excelente combustível e pode ser usada para construção (GFU, 2013).

Recentemente, Lancellotti *et al.* (2014) conseguiram pela primeira vez, estabelecer micorrizas arbutóides entre *Tuber borchii* (uma espécie de trufa) e *Arbutus Unedo*. Isto representa uma oportunidade económica importante nas zonas mediterrânicas, aliando o cultivo de trufas com a produção de frutos para alimentação.

É valorizada como planta ornamental devido à coloração vermelha intensa dos frutos durante o Outono e Inverno e às suas flores brancas ou rosadas no Outono (Celikel *et al.*, 2008; Sá *et al.*, 2011) e pelo facto destas características de floração e frutificação ocorrerem simultaneamente na mesma planta (Takrouni *et al.*, 2012). Zizzo *et al.* (2009) avaliaram o potencial do medronheiro como planta ornamental, analisando características de floração e frutificação bem como a aparência global do arbusto, e ainda a diversidade genética das várias populações de *A. Unedo* na ilha da Sicília na Itália.

As flores de medronheiro são uma boa fonte de néctar e pólen para abelhas (*Apis mellifera*) que produzem, a partir desta espécie, um mel característico bastante apreciado pelo seu aroma, sabor amargo e cor escura devido ao alto teor de compostos fenólicos (Bianchi *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2012). O mel monofloral de medronheiro é um produto

típico de algumas regiões mediterrânicas, particularmente da ilha da Sardenha, e tem um valor económico cerca de 6 vezes superior ao mel monofloral obtido de outras espécies (Bianchi *et al.*, 2005). Estudos realizados por Rosa *et al.* (2011) demonstraram elevado potencial antioxidante no mel monofloral de A. *Unedo*.

2.2. Enzimas

2.2.1. Propriedades gerais

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações e, apresentam características que tornam o seu uso vantajoso quando comparadas com os catalisadores químicos convencionais. Pode destacar-se uma elevada eficiência catalítica, muitas vezes superior à dos catalisadores químicos, e o elevado grau de especificidade que lhes permite discriminar não só entre reações químicas mas também entre substratos (especificidade do substrato), partes similares de moléculas (regioespecificidade) e entre isómeros óticos (esterioespecificidade) (Cabral *et al.*, 2003; Krajewska, 2004; Lei *et al.*, 2007a; Milétić *et al.*, 2012).

A enorme especificidade das enzimas relativamente aos substratos deve-se ao centro ativo ou centro catalítico da enzima. Esta especificidade garante que a reação catalisada não é perturbada por outras reações laterais, resultando na produção do produto final pretendido, e na eliminação dos subprodutos indesejáveis. Esta reação proporciona rendimentos substancialmente mais elevados, reduzindo os custos materiais (Krajewska, 2004). As enzimas geralmente operam em condições moderadas de temperatura, pressão e pH, com velocidades de reação da ordem das obtidas por catalisadores químicos em condições mais extremas (Krajewska, 2004; Milétić *et al.*, 2012). Isso contribui para a poupança substancial da energia do processo e para a redução dos custos de produção. Além disso, não apresentam praticamente problemas de eliminação sendo estas biodegradáveis. Este conjunto único de características das enzimas como catalisadores tem sido explorado desde a década de 60 e a maioria dos processos catalisados por elas têm sido introduzidos com sucesso na indústria, por exemplo, na produção de produtos alimentares, farmacêuticos e agroquímicos (Krajewska, 2004; Lei *et al.*, 2007a; Mateo *et al.*, 2007).

2.2.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

As enzimas têm uma estrutura tridimensional característica e, ao serem submetidas a temperaturas elevadas e pH extremos podem sofrer desnaturação e consequente perda de atividade biológica. Por outro lado, cada enzima apresenta atividade máxima quando sujeita às condições de temperatura e pH ótimo (Cabral *et al.*, 2003).

A capacidade catalítica de cada enzima depende da conformação tridimensional do centro ativo. Como as enzimas são constituídas por aminoácidos (contém grupos ionizáveis), o pH influencia diretamente a sua ionização. Uma pequena alteração no pH impede que os grupos ionizáveis continuem carregados, impedindo assim a formação do complexo Enzima-Substrato (ES) e consequentemente a ocorrência da reação catalítica.

Quando se usam valores de pH próximos do ótimo, a atividade da enzima é menor comparativamente ao uso de um pH ótimo, contudo essa diminuição de atividade é reversível. Para valores extremos de pH, dá-se o desenrolamento irreversível da proteína (desnaturação), perdendo assim toda a sua atividade enzimática. Contudo, é necessário salientar que, cada enzima apresenta o seu pH ótimo (Cabral *et al.*, 2003).

O aumento da temperatura aumenta a probabilidade de colisão entre as moléculas e faz com que uma maior quantidade de moléculas tenha energia de ativação suficiente para que a reação ocorra. No entanto, tal como para o pH, cada enzima apresenta uma temperatura ótima. Temperaturas demasiado baixas ou demasiado elevadas levam à desnaturação da enzima podendo perder assim a sua atividade de forma irreversível.

2.3. Enzimas carboidrases

As enzimas carboidrases são enzimas que catalisam a degradação de carboidratos, ou seja, hidrolisam as ligações glicosídicas entre monossacarídeos formadores de oligossacarídeos ou polissacarídeos.

As pectinases, enquanto enzimas carboidrases, podem ser de origem vegetal ou microbiana, produzidas por várias estirpes de fungos, leveduras e bactérias (Alimardani-Theuil *et al.*, 2011). As de origem fúngica são geralmente usadas como preparações comerciais. Espécies do género *Aspergillus* são frequentemente usadas nas indústrias de

sumos pela sua alta atividade pectolítica exibida (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001; Fawote e Odunfa, 2003; Plaza *et al.*, 2008).

Relativamente às suas aplicações, existem dois tipos de pectinases: as alcalinas e as acídicas. As pectinases alcalinas são usadas principalmente na degomagem e na maceração de plantas têxteis (como o algodão) e no pré-tratamento das águas residuais pecticas nas indústrias de sumo de fruta. Estas enzimas provêm principalmente de fontes bacterianas, como *Bacillus* spp (Kashyap *et al.*, 2001). As enzimas pecticas acídicas, usadas nas indústrias de sumos de fruta e na produção de vinho, provêm frequentemente de fontes fúngicas, especialmente de *Aspergillus niger*. Os sumos produzidos por estas indústrias incluem comercialmente:

- I. Sumos clarificados gaseificados (maçã, pera e uva);
- II. Sumos com turbidez (sumos de citrinos, sumo de ameixa, sumo de tomate e néctares);
- III. Produtos unicelulares, em que a intenção é preservar a integridade das células das plantas por hidrólise seletiva de polissacáridos da lamela média.

A adição de enzimas pectolíticas (pectinases) resulta na degradação da pectina (bem como de outros componentes de alto peso molecular) (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005). Estas enzimas atuam apenas nas regiões de homogalacturonana e ramnogalacturonana das pectinas (Alimardani-Theuil *et al.*, 2011).

As pectinases permitem diminuir a viscosidade, aumentando consequentemente o rendimento da extração de sumos, melhoram a sua aparência e reduzem o tempo de filtração (Alkorta *et al.*, 1998; Fernández-González *et al.*, 2004). Outra aplicação das enzimas pectolíticas é o tratamento seletivo dos concentrados com endopoligalacturonase (endo- PG) para provocar a hidrólise limitada das pectinas de modo a reduzir a viscosidade (sumos cítricos tendem a gelificar quando concentrados) (Alkorta *et al.*, 1998).

As pectinases expõem parte das cargas positivas da enzima reduzindo a repulsão electrostática entre as partículas o que provoca a aglomeração das mesmas, formando-se partículas maiores. Eventualmente estas partículas maiores depositam, mas para melhorar o processo, podem ser adicionados agentes flocculantes (clarificantes) como a

gelatina, taninos e bentonite (tipo de argila). Leveduras e outros microrganismos, que podem ter contaminado o sumo, também são precipitados pelos clarificantes. Obtém-se, então, um sumo transparente mas nem por isso clarificado. Uma segunda centrifugação e subsequente filtração são necessárias para dar a clareza ao sumo, sendo que esta é apreciada pelos consumidores (Kashyap *et al.*, 2001).

Tendo em conta que o medronho apresenta pH médio de $3,72 \pm 0,75$ (Cavaco, 2007), com valores entre 3,2 e 4,7 (Noronha, 2001; Özcan & Haciseferogullari, 2007; Ruiz-Rodrigues *et al.*, 2011; Sulusoglu *et al.*, 2011) e como o produto utilizado é a pasta de medronho resultante da trituração integral dos frutos, o mais adequado para este trabalho é a utilização de enzimas pécticas acídicas.

Nesta categoria foram selecionadas duas enzimas comerciais (Viscozyme® L e Pectinex®) que pelas suas propriedades poderiam surtir mais efeito no sentido de proporcionar o aumento do rendimento de extração de polpa de medronho com diminuição aparente da sua viscosidade. Assim poderia surgir uma nova categoria de produtos derivados do medronho, de características composicionais idênticas ao fruto em natureza, isentos de sementes e esclereídeos, com potencial de utilização nos mais variados setores da indústria alimentar, como a produção de bebidas à base de fruta, doces, pastelaria, gelados, iogurtes, entre outros.

2.3.1. Viscozyme® L

A Viscozyme® L é um complexo de multi-enzimas degradativas dos hidratos de carbono (arabanase, celulase, β -glucanase, hemicelulase e xilanase) com maior atividade enzimática para a β -glucanase. A Viscozyme® L foi produzida a partir de uma estirpe selecionada do fungo *Aspergillus* (NovoNordish, 1993).

É uma enzima utilizada na quebra de paredes celulares, para a extração de componentes úteis dos tecidos vegetais e no processamento de cereais e materiais vegetais. A baixas temperaturas, a enzima irá ter um menor rendimento de extração e degradação do material desejado.

A natureza multi-componente da Viscozyme® L tem particular utilidade para o processamento de matérias vegetais destinados à produção de álcool, cerveja, amido e indústrias relacionadas. A sua capacidade para degradar os polissacarídeos não amiláceos

pode melhorar a disponibilidade do amido na fermentação, reduzir a viscosidade e, portanto, melhorar os rendimentos de extração (NovoNordish,1993).

A Viscozyme® L é apresentada sob a forma líquida com atividade enzimática de 120 FBG (unidades de beta-glucanase fúngica) por mililitro. As condições ideais para maximizar a atividade deste complexo são pH 3,3-5,5, temperatura entre 40-50 °C e dosagens entre 0,05 a 0,1% da massa (NovoNordish,1993).

2.3.2. Pectinex®

A Pectinex® é uma preparação enzimática pectolítica, produzida através da fermentação submersa de espécies de *Aspergillus*. A sua composição foi especialmente desenvolvida para processamento otimizado de polpa de frutas (Begerow, 2016) através do seu tratamento enzimático e maceração de tecido vegetal. A pectina solúvel e insolúvel presente nas polpas bem como os polissacarídeos, são removidos. Quando aplicada resulta num aumento significativo da capacidade de separação sólido/líquido e, consequentemente maior produção de sumo (NovoNordish,2007).

Como vantagens de aplicação na polpa destacam-se:

- Maior rendimento de extração
- Diminuição da produção de resíduo/bagaço
- Aumento da eficiência da operação de filtração das massas maceradas (NovoNordish,2007).

A Pectinex® é comercializada na forma líquida e possui uma atividade enzimática de 26000 PG (unidades de poligalacturonase) por mililitro. As condições ideais, recomendadas pelo fornecedor, para maximizar a atividade desta enzima são pH=3,5, temperatura de 35 °C e dosagens de 200 µL/kg (NovoNordish,2007).

3. Materiais e métodos

Todos os tratamentos enzimáticos e caracterização analítica dos vários produtos, fruto em natureza, polpas e bagaço, foram feitos em triplicado, nos laboratórios da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra.

3.1. Matéria-prima

A matéria-prima (frutos de *Arbutus unedo* L.) foi colhida na zona centro de Portugal, durante os meses de Setembro e Outubro de 2016, embalada em vácuo e conservada em câmaras de congelação (-18°C).

Para a realização dos ensaios enzimáticos foi retirada uma amostra representativa de medronhos (6,8 kg). Os frutos, após descongelação, foram triturados e a pasta macerada resultante foi separada em 12 amostras com aproximadamente 600 g, devidamente identificadas e novamente congeladas a -18 °C.

Antes de se aplicar o tratamento enzimático, a amostra foi descongelada à temperatura de operação (temperatura ambiente, entre 20-25 °C ou a 45 °C) e novamente divididas em copos com 50 g. Cada copo foi devidamente identificado com a concentração de enzima que iria ser aplicada (0 (controlo), 1, 2 ou 4 µL/g de macerado).

Após inoculação da enzima, as amostras foram colocadas em estufa a 20-25 °C ou 45 °C, durante o tempo determinado, 30 ou 60 minutos. Imediatamente após ter terminado o período de incubação, as amostras foram transferidas para micro-ondas com potência de 700 W durante 15 segundos para desnaturação e consequente cessação da atividade enzimática e, imediatamente passadas por um banho de água gelada, para arrefecimento da amostra até à temperatura ambiente.

Devido ao facto do medronho ser um fruto constituído por pequenas sementes de tegumento castanho, que permanecem na polpa após maceração, é impossível a sua separação manualmente. Por esse motivo a sua separação ocorreu através de prensagem através de tela sintética (tecido TV, vulgarmente utilizado no processamento de queijo) com dimensão de poro suficientemente pequeno para não deixar passar as sementes e esclereídeos, permitindo assim a separação da polpa do bagaço. A figura 3 resume esquematicamente a metodologia anteriormente descrita usada para extração de polpa de medronho.

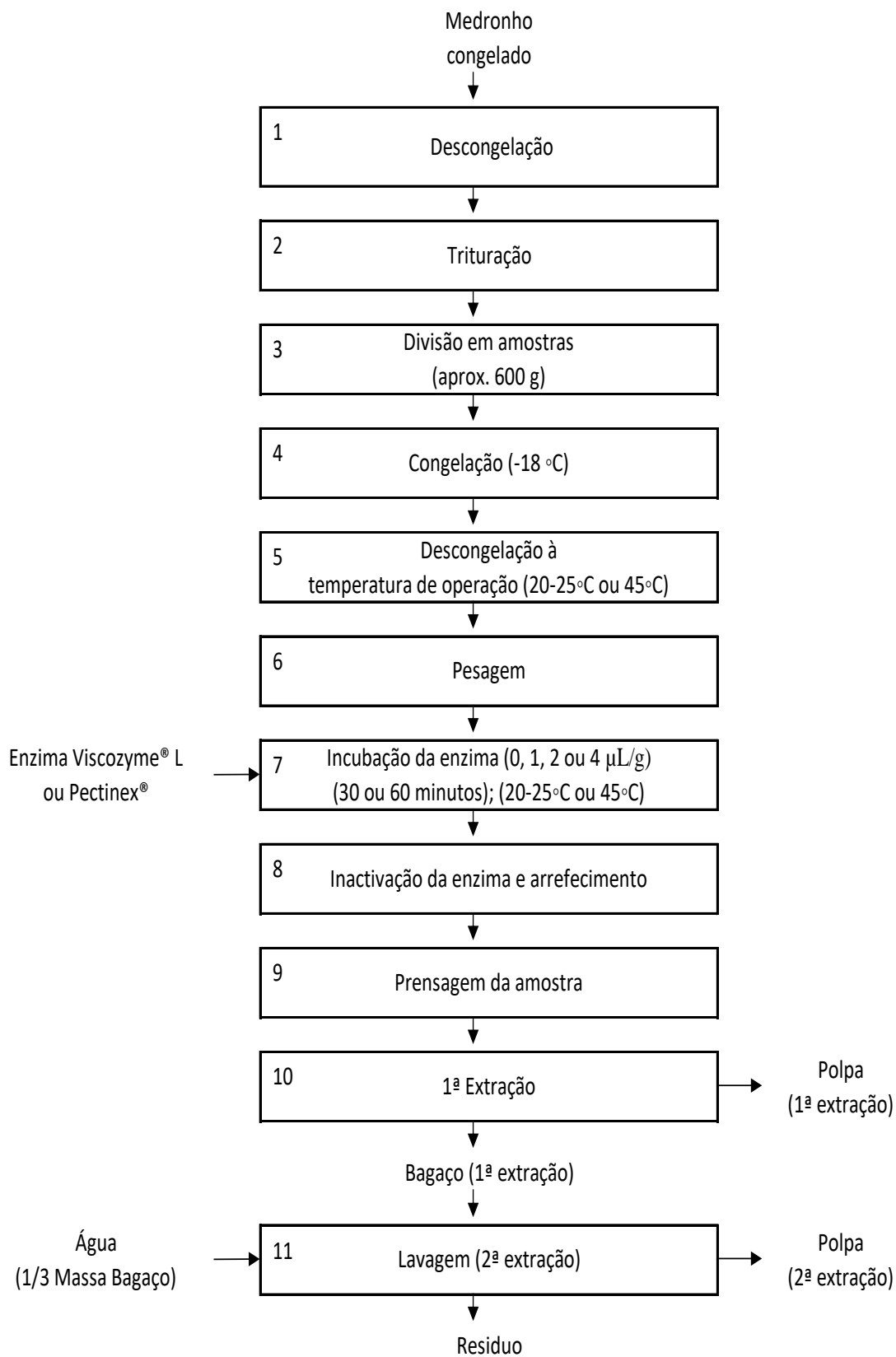


Figura 3 - Metodologia de extração de polpa de medronho coadjuvado pela ação de enzimas carboidrases

Como já foi referido estudou-se o efeito da aplicação da Viscozyme® L e da Pectinex® na extração de polpa de medronho a partir dos frutos macerados em três cenários diferentes consoante o tempo de tratamento, a temperatura de incubação e concentração da enzima ($\mu\text{L/g}$ de macerado). O protocolo para cada tratamento enzimático encontra-se no anexo 1. A tabela 2 apresenta a condições em que cada uma das enzimas foi utilizada. Paralelamente na preparação do controlo procedeu-se à incubação da polpa, à temperatura ambiente (20-25 °C) e sem adição de enzimas.

Tabela 2 - Condições de aplicação das enzimas Viscozyme® L e Pectinex® à pasta de medronho macerado

Tempo de incubação (minutos)	Temperatura de incubação (°C)	Concentração da enzima ($\mu\text{L/g}$ de macerado)
30	20-25 (temperatura ambiente)	0 (controlo)
		1
		2
		4
60	20-25 (temperatura ambiente)	0 (controlo)
		1
		2
		4
30	45	0 (controlo)
		1
		2
		4

3.2. Rendimento de extração e características físico-químicas dos produtos obtidos (polpas de 1ª e de 2ª extração)

De modo a avaliar a ação das diferentes enzimas e condições de tratamento sobre a pasta macerada de medronho, foram avaliados os rendimentos de extração de polpa e caracterizados os produtos resultantes do ponto de vista físico-químico quanto à cor ($L^*a^*b^*$), acidez titulável (g ácido cítrico/100 g), pH, extrato seco, sólidos insolúveis, sólidos solúveis (°Brix) e viscosidade aparente (Pa.s), quando aplicável.

3.2.1. Rendimento de extração

O rendimento de extração em polpa foi obtido através da razão entre a quantidade de polpa obtida resultante da prensagem através tecido TV, de amostras de 50 g de pasta macerada de medronho, resultante da sua prensagem (etapa 9 da figura 3), submetida ou não (controlo) a tratamento enzimático nas condições descritas na tabela 2. O resultado foi expresso em percentagem e foi avaliado na polpa de 1ª extração e no bagaço de 1ª extração.

Devido à quantidade significativa de polpa que ainda fica aderente à componente sólida do bagaço após a primeira extração, fez-se uma lavagem (etapa 11 da figura 3) com uma quantidade de água correspondente a 1/3 da massa de bagaço obtida em cada ensaio. Depois de devidamente homogeneizado, procedeu-se à separação e contabilização da polpa (de 2ª extração) extraída de forma similar à da primeira extração, resultando uma polpa de 2ª extração e resíduo.

3.2.2. Cor

A cor foi medida através do colorímetro (Minolta CR-200b). O colorímetro fornece o valor de três coordenadas L^* , a^* , b^* . Onde L^* representa a luminosidade e varia de 0 (preto) a 100 (branco). O eixo a^* representa a cor entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos) e o eixo b^* fornece a variação de cor entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos). Este parâmetro foi avaliado na pasta macerada de medronho e nas polpas de 1ª extração e de 2ª extração.

3.2.3. Acidez titulável

Da pasta macerada de medronho e das polpas de 1ª extração e de 2ª extração retiraram-se amostras de aproximadamente 5 g, para copos distintos aos quais se adicionaram 50 cm³ de água destilada. As misturas foram submetidas a agitação até se obter uma solução homogénea.

Para cada uma das amostras, adicionou-se lentamente uma solução de hidróxido de sódio (0,1 N) recorrendo a uma bureta graduada.

Utilizou-se o potenciômetro (Crison micro pH 2002, Espanha) com eletrodo de pH 52 03 para acompanhar a subida de pH durante o processo. Assim que o potenciômetro indicou pH 8,1, procedeu-se ao registo da quantidade (mL) de NaOH gasto na titulação. O resultado foi expresso em g de ácido cítrico/100 g de polpa, e obtido através da expressão (1):

$$Acidez (\%) = \frac{64 \times 0,1 \times N \times V \text{ gasto (mL)}}{Massa amostra (g)} \quad (1)$$

3.2.4. pH

O pH foi medido com um potenciômetro digital de leitura direta, calibrado previamente com solução tampão de pH 7 e pH 4. Após cada medição o eletrodo foi limpo com água destilada.

Este parâmetro foi avaliado na pasta macerada de medronho e nas polpas de 1ª extração e de 2ª extração.

3.2.5. Sólidos totais

A determinação da matéria seca das amostras foi efetuada por secagem em estufa a 105 °C até peso contante. A perda de água foi calculada pela diferença de massa antes e após a secagem da amostra. O extrato seco, ou teor de sólidos totais, foi determinado segundo a equação 2.

$$Extrato seco (\%) = \frac{M_{Amostra Seca (g)} \times 100}{M_{Amostra (g)}} \quad (2)$$

A percentagem de humidade foi calculada a partir do valor de extrato seco segundo a equação 3.

$$Humidade (\%) = 100 - Extrato seco (\%) \quad (3)$$

Este parâmetro foi avaliado na pasta macerada de medronho e na polpa de 1ª extração.

3.2.6. Sólidos insolúveis

Entende-se por sólidos insolúveis de frutos, respetivos sumos, conservas e produtos secos o conjunto insolúvel dos seus componentes fixos obtidos, após lavagem com água quente e posterior secagem em estufa a 105 °C. O teor de sólidos insolúveis dos produtos exprime-se pela percentagem em peso (Netto, s/d).

$$\text{Sólidos insolúveis (\%)} = \frac{M_{\text{Amostra lavada seca (g)}} \times 100}{M_{\text{Amostra (g)}}} \quad (4)$$

Este parâmetro foi avaliado na pasta macerada de medronho.

3.2.7. Sólidos solúveis

O índice refratométrico, ou grau °Brix, é frequentemente utilizado para quantificar a percentagem de matéria solúvel presente nos frutos. Por exemplo, açúcares, ácidos, vitaminas, aminoácidos e pectinas. Como a solubilidade dos açúcares depende da temperatura é necessário que o produto esteja à temperatura ambiente ou, dependendo do equipamento, pode-se ter que proceder à correção do teor de sólidos solúveis para a temperatura de 20 °C.

A sua determinação foi feita com um refratómetro digital HANNA HI 96801 (escala 0- 30%) na pasta de macerada de medronho e nas polpas de 1ª extração e de 2ª extração.

3.2.8. Reologia da polpa de medronho

A viscosidade aparente da polpa de 1ª extração de medronho foi determinada utilizando o reómetro Rheostress 6000 (Haake, Thermo Scientific, Austrália). Os ensaios foram realizados imediatamente após a extração da polpa, a $20 \pm 0,1$ °C com rampa de cisalhamento linear (γ) ascendente e descendente entre 0,1 e 10 s^{-1} . Para cada ciclo, a taxa de cisalhamento aumentou ao longo de um período de 100 s, foi mantida no limite superior durante 20 s e depois diminuiu novamente durante um período de 100 s. A tixotropia foi registada como a área do gráfico resultante entre as curvas de tensão de corte (σ) ascendente e descendente em função da taxa de cisalhamento (γ).

A rampa de taxa de cisalhamento ascendente foi utilizada para ajustar a Lei de Potência ou o modelo de Ostwald (equação 5) e determinar o índice de consistência (k) e o factor de lei de potência (n).

$$\sigma = k\gamma^n \text{ ou } \eta = k\gamma^{n-1} \quad (5)$$

onde η é a viscosidade aparente (Pa.s) e γ é a taxa de cisalhamento (1/s) (Blair, *et al.* 1939).

3.2.9. Análises estatísticas

Todas as experiências foram realizadas em triplicado. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) usando o software Estatística V.12.0 (Statsoft, 2013). Utilizou-se o teste Tukey HSD para verificar a existência de diferenças significativas entre os valores das médias dos parâmetros avaliados, com um nível de confiança de 95%.

4. Resultados e discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados das análises efetuadas ao medronho (frutos em fresco) e aos produtos resultantes após aplicação dos tratamentos enzimáticos descritos no ponto 3.1, polpa de 1º extração e polpa de 2º extração.

4.1. Caracterização dos medronhos (pasta macerada de medronho)

De modo a caracterizar a matéria-prima foram analisados vários parâmetros, tais como °Brix, pH, cor, acidez titulável, extrato seco, humidade e sólidos insolúveis. Os resultados são apresentados na tabela 3. Estes resultados são concordantes com descritos na bibliografia (Noronha, 2001; Özcan & Haciseferoğullari, 2007; Ruiz-Rodrigues *et al.*, 2011; Sulusoglu *et al.*, 2011; Celikel *et al.*, 2008; Cavaco, 2007).

Tabela 3 - Caracterização do medronho

Parâmetro		Resultado
°Brix		26,0±0,0
Cor	L*	45,1±0,0
	a*	15,8±0,4
	b*	26,6±0,1
pH		3,3±0,0
Acidez titulável % (g ác. cítrico/100g pasta)		1,1±0,1
Humidade (%)		65,1±1,4
Extrato seco (%)		34,9±1,4
Sólidos insolúveis (%)		21,1±2,3

4.2. Caracterização físico-químicas da polpa de 1ª extração

4.2.1. Rendimento de extração (%)

Quanto à aplicação da enzima Viscozyme® L (Figura 4), verifica-se que o rendimento de extração não é significativamente aumentado pela aplicação do tratamento enzimático nas condições descritas quando comparado com o controlo (sem aplicação de enzima). Ainda assim verificam-se maiores rendimentos quando aplicadas temperaturas mais elevadas (45 °C), coincidente com a temperatura ótima e maior concentração

daquela enzima, $46,9 \pm 0,5\%$. Estranhamente, observou-se um rendimento de extração inferior a qualquer um dos controlos (entre 40,8 a 42,3%) quando aplicada a Viscozyme® L à temperatura ambiente (20-25°C), durante 60 minutos para qualquer uma das concentrações utilizadas, facto para o qual não temos explicação e que necessitará de confirmação futura com realização de novos ensaios.

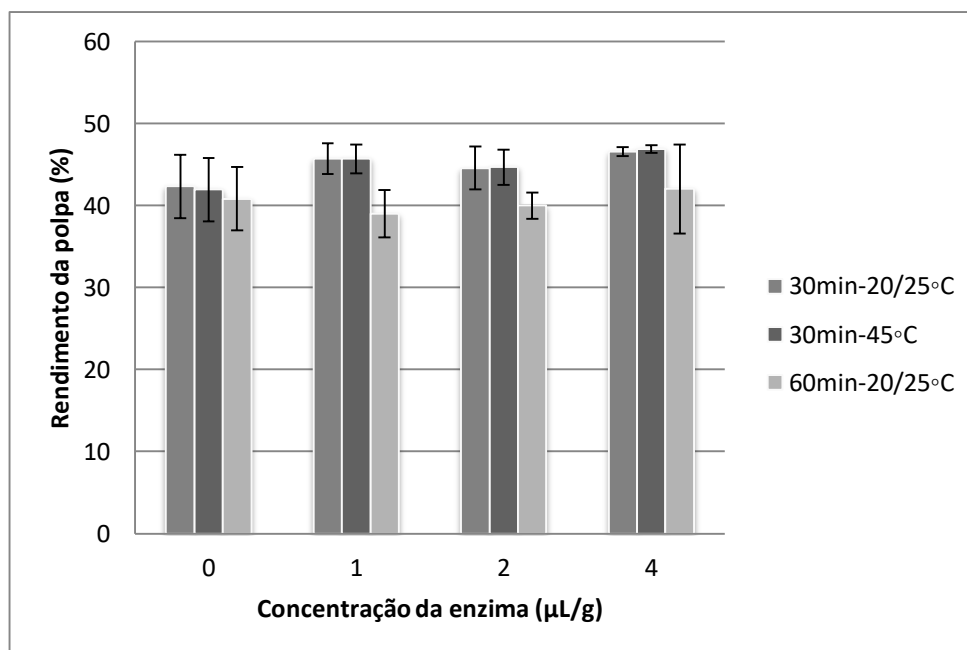


Figura 4 - Rendimento de extração de polpa (%) (1ª extração) com a aplicação da Viscozyme® L

A figura 5 mostra que o rendimento de extração da polpa quando aplicada a Pectinex® é semelhante ou superior aos registados para os controlos (sem enzima). O rendimento de extração mais elevado ($54,9 \pm 1,1\%$) foi obtido quando aplicada a Pectinex® na concentração de 2 µL/g, à temperatura de 45 °C durante 30 minutos. No entanto este resultado não é significativamente diferente do alcançado no tratamento 20-25 °C (temperatura ambiente) durante 30 minutos ($52,8 \pm 1,1\%$) aplicando a concentração mais baixa de enzima (1 µL/g), o que desta forma se pode traduzir em custos mais baixos de processamento, já que implica a utilização de menor quantidade de enzima e ausência de gastos de energia durante o tempo de incubação.

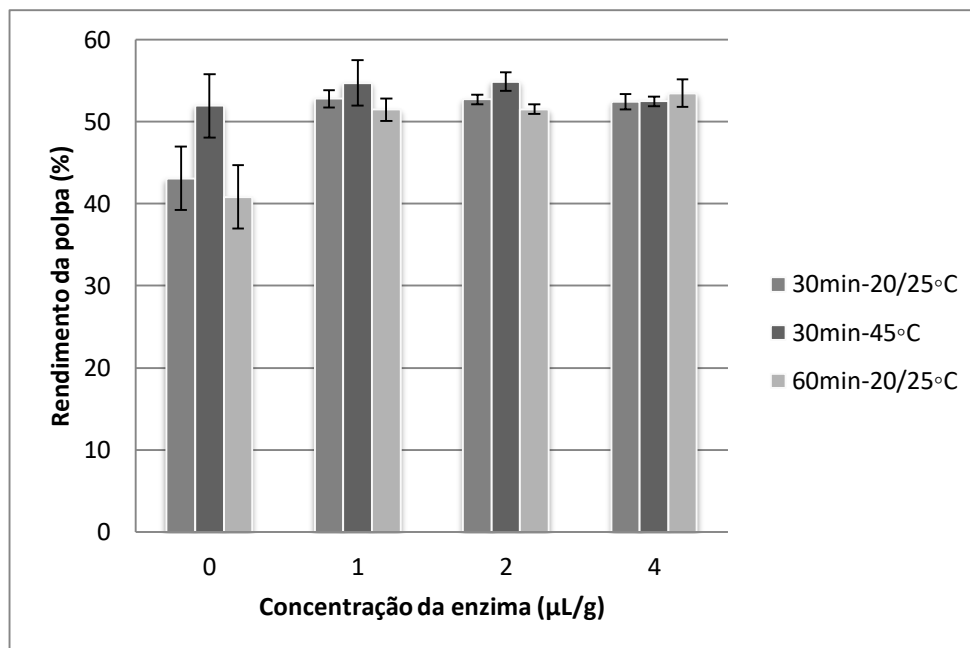


Figura 5 - Rendimento de extração de polpa (%) (1ª extração) com a aplicação da Pectinex®

Quando comparada a utilização da Viscozyme® L (Figura 4) com a da Pectinex® (Figura 5), verifica-se que o rendimento de extração da polpa é sempre superior quando utilizada esta última enzima. Desta forma pode-se afirmar que a Pectinex® é preferida à Viscozyme® L na produção de polpas de medronho, nas condições estudadas.

4.2.2. °Brix

Como expectável, dadas as características das enzimas utilizadas, verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$) do °Brix para a maioria das polpas produzidas quando comparado com os controlos (*c.a.* 26 °Brix), quer nas polpas produzidas após a incubação com Viscozyme® L (Figura 6) quer por a Pectinex® (Figura 7). Verifica-se também que esse aumento se acentua com o aumento da concentração das enzimas e não é tão dependente quer do tempo quer da temperatura de incubação, no caso da Viscozyme® L. À semelhança do rendimento da extração da polpa, é também com o tratamento com Pectinex® que são alcançados maiores valores de °Brix ($27,3 \pm 0,1\%$) à temperatura ambiente, durante 30 minutos na concentração de 4 µL/g.

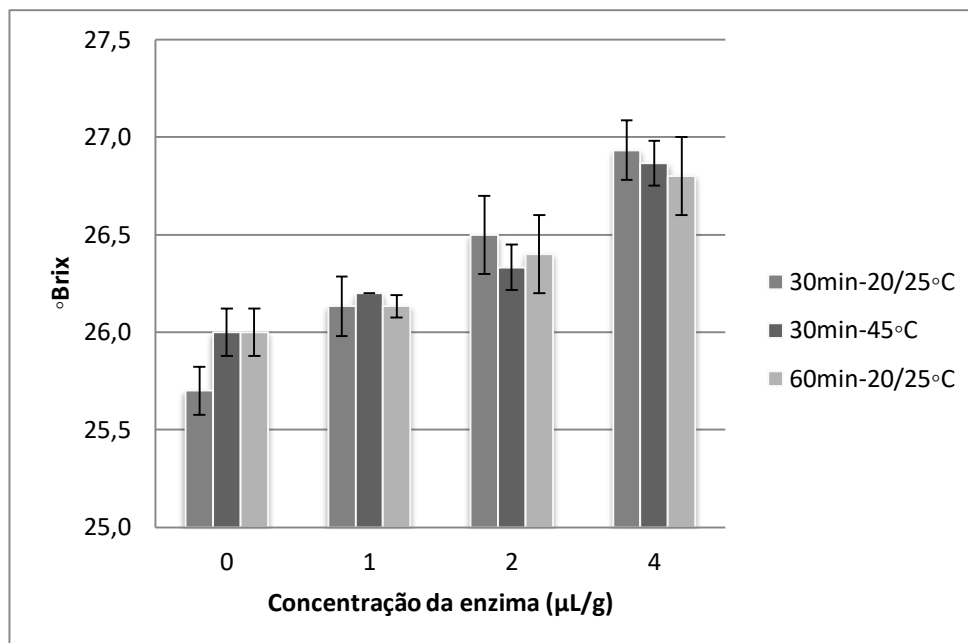


Figura 6 - °Brix na polpa de 1ª extração com aplicação da Viscozyme® L

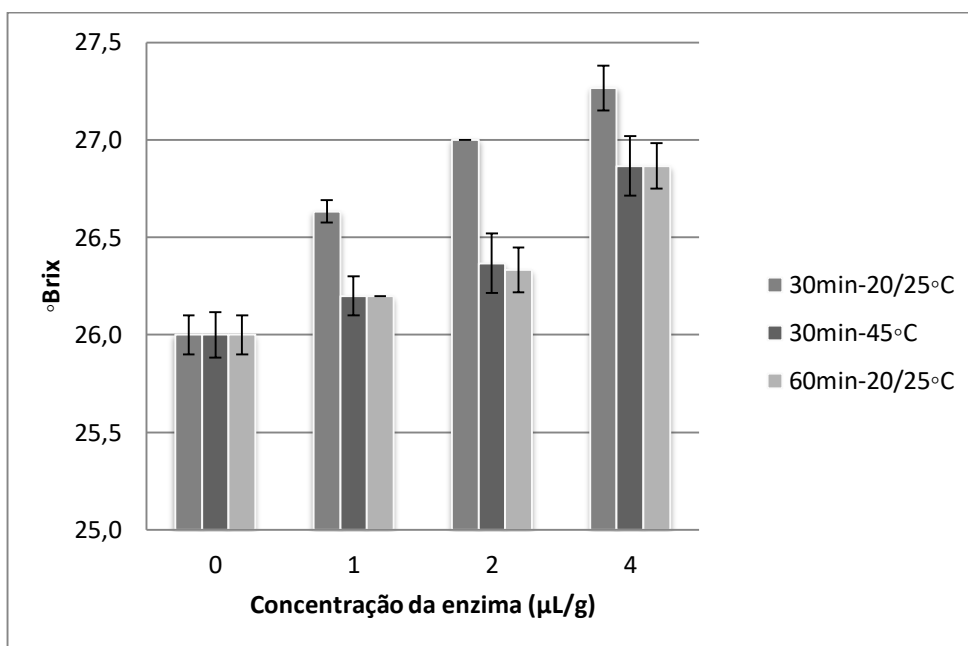


Figura 7 - °Brix na polpa de 1ª extração com aplicação da Pectinex®

Quando comparada a utilização da Viscozyme® L (Figura 6) com a Pectinex® (Figura 7), verifica-se que o °Brix na polpa obtém valores superiores quando utilizada esta última enzima. Afirma-se então que a Pectinex® é preferida à Viscozyme® L na produção de polpas de medronho com maior °Brix.

4.2.3. Viscosidade aparente

Quanto à aplicação da enzima Viscozyme® L verifica-se uma queda acentuada da viscosidade aparente (Figura 8) na polpa de medronho em relação aos valores do controlo, especialmente se tido em conta o tratamento à temperatura ambiente (20-25 °C) por 30 minutos ($7,98 \pm 0,15$ Pa.s). Entre os vários tratamentos, verificam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) de viscosidade aparente mesmo entre os diferentes tratamentos com a Viscozyme® L. O valor mais baixo ($0,88 \pm 0,38$ Pa.s) foi obtido quando aplicada esta enzima à temperatura ótima (45 °C) durante 30 minutos, na concentração de 4 $\mu\text{L/g}$.

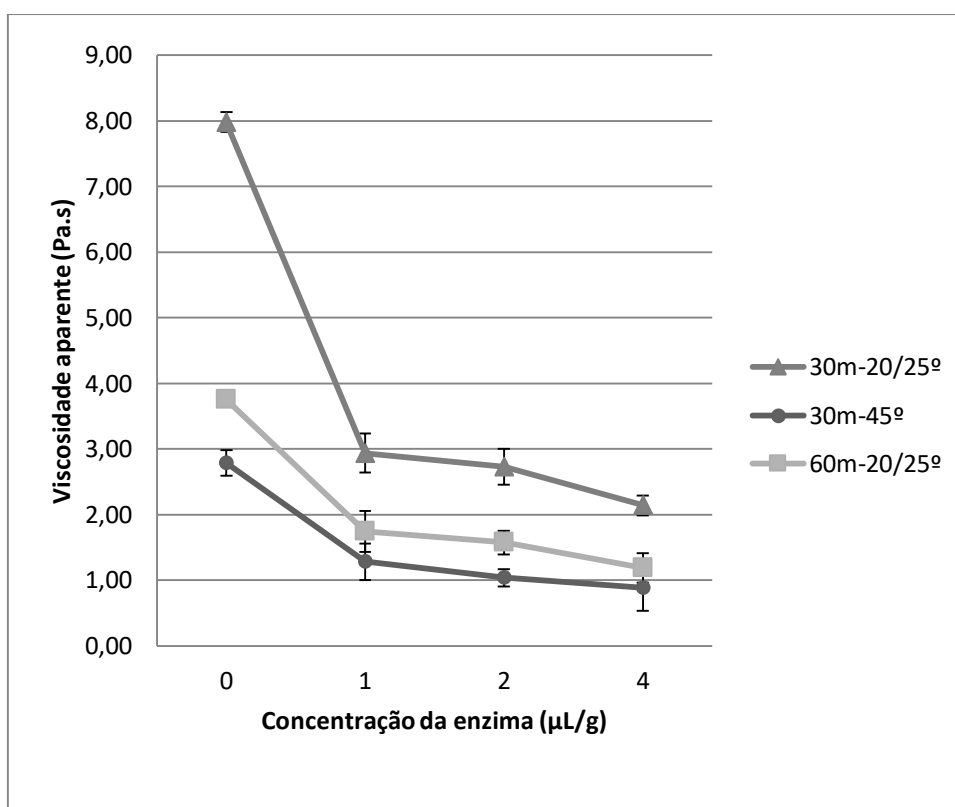


Figura 8 – Viscosidade aparente na polpa de 1ª extração com aplicação da Viscozyme®

A figura 9 mostra que as polpas obtidas a partir de tratamentos com a aplicação da Pectinex® também sofrem um decréscimo acentuado da viscosidade aparente quando comparado com a dos controlos (a variar entre $5,88 \pm 0,17$ Pa.s para o tratamento de 30 minutos à temperatura ambiente e $8,90 \pm 0,16$ Pa.s para o tratamento a 45 °C). O menor valor de viscosidade aparente foi observado ($1,19 \pm 0,22$ Pa.s) para o tratamento a 45 °C, durante 30 minutos, na concentração mais elevada (4 $\mu\text{L/g}$). Não são observadas

diferenças significativas somente entre os tratamentos com concentrações de 1 e 2 $\mu\text{L/g}$, 30 minutos, a 20-25 e 45 °C.

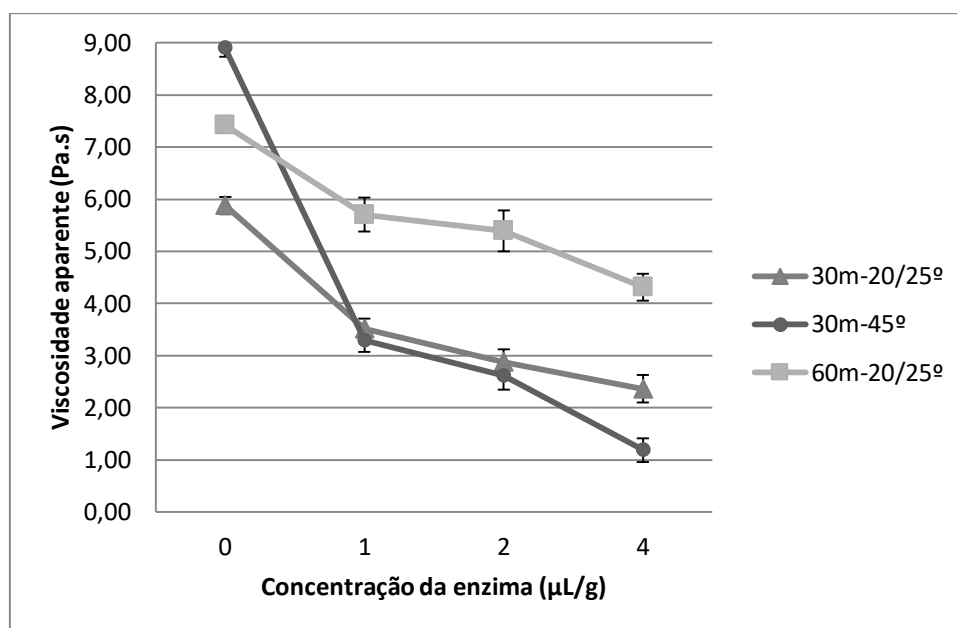


Figura 9 – Viscosidade aparente na polpa de 1ª extração com aplicação da Pectinex®

Quando comparada a utilização da Viscozyme® L (Figura 8) com a Pectinex® (Figura 9), verifica-se que a viscosidade aparente das polpas resultantes apresenta sempre valores mais baixos quando a Viscozyme® L é utilizada.

A tabela 4 apresenta os valores da tixotropia e ainda índice de consistência (k) e o fator de lei de potência (n) do modelo de Oswald pertinentes às polpas de 1ª extração.

A polpa de medronho é classificada como um fluido não newtoniano – pseudoplástico (a viscosidade aparente depende da taxa de cisalhamento) já que o fator de lei de potência (n) apresenta valores inferiores à unidade. Globalmente observa-se que as polpas resultantes dos tratamentos com Viscozyme® L apresentam menores valores quer de tixotropia quer para o índice de consistência (k) quando comparados as provenientes do tratamento com Pectinex® e do controlo, em conformidade com comportamento o observado quanto à viscosidade aparente destes produtos.

No anexo II encontram-se representados graficamente os ensaios de fluxo pertinentes à determinação da tixotropia e dos parâmetros do modelo de Oswald (eq. 5), índice de consistência (k) e o fator de lei de potência (n).

Tabela 4 - Tixotropia, índice de consistência (k) e fator da lei de potência (n) do Modelo de Oswald da polpa de 1ª extração

Enzima	Tempo (min.) Temperatura (°C)	[Enzima] (μL/g)	Tixotropia (Pa/s)	Modelo de Oswald (equação 5)	
				k (Pa.s ⁿ)	n ⁽¹⁾
Controlo	30 - 20/25	0	102,2±31,6 ^{b,c}	53,1±8,7 ^{b,c,d}	0,28±0,05
	30 - 45	0	65,8±5,6 ^{c,d}	73,4±3,8 ^a	0,23±0,01
	60 - 20/25	0	50,2±14,9 ^{c,d}	25,3±1,1 ^{e,f,g,h}	0,27±0,07
Viscozyme® L	30 - 20/25	1	89,3±37,6 ^{b,c,d}	39,3±13,8 ^{d,e,f}	0,23±0,02
		2	83,0±4,4 ^{c,d}	34,7±3,4 ^{d,e}	0,20±0,01
		4	61,0±3,0 ^{c,d}	26,1±0,8 ^{e,f,g,h}	0,17±0,03
	30 - 45	1	21,8±17,0 ^d	6,0±1,6 ^h	0,22±0,08
		2	27,9±19,9 ^{c,d}	10,8±3,9 ^{g,h}	0,20±0,06
		4	54,6±28,8 ^{c,d}	17,3±8,8 ^{e,f,g,h}	0,18±0,03
	60 - 20/25	1	53,0±22,8 ^{c,d}	6,2±0,6 ^h	0,23±0,07
		2	41,0±30,0 ^{c,d}	14,3±5,1 ^{f,g,h}	0,21±0,03
		4	24,0±7,8 ^{c,d}	11,1±3,5 ^{g,h}	0,24±0,02
Pectinex®	30 - 20/25	1	93,0±13,5 ^{b,c,d}	40,9±3,5 ^{c,d,e}	0,23±0,01
		2	78,2±3,1 ^{c,d}	33,5±2,4 ^{d,e,f,g}	0,19±0,02
		4	73,4±21,0 ^{c,d}	29,6±5,3 ^{e,f,g}	0,18±0,02
	30 - 45	1	106,4±8,5 ^{b,c,d}	42,3±4,1 ^{c,d,e}	0,22±0,01
		2	87,0±10,6 ^{b,c,d}	34,7±4,6 ^{d,e,f}	0,18±0,01
		4	63,2±20,0 ^{c,d}	25,1±6,9 ^{e,f,g,h}	0,16±0,01
	60 - 20/25	1	171,8±18,0 ^{a,b}	46,4±23,7 ^{a,b,c}	0,28±0,03
		2	234,5±67,7 ^a	79,3±17,5 ^a	0,27±0,02
		4	223,0±59,8 ^a	68,9±13,9 ^{a,b}	0,27±0,01

^{a,b,c,d,e,f,g,h} diferentes letras na mesma coluna significam tratamentos com diferenças significativas (p<0,05); ⁽¹⁾ Sem diferenças significativas (p>0,05).

4.2.4. Cor

As figuras 10 e 11 representam, respetivamente, a cor das polpas obtidas por ação do tratamento com Viscozyme® L e a Pectinex® em comparação com os respectivos controlos. Verifica-se que a cor das polpas de medronho não é influenciada por qualquer uma das enzimas utilizadas em qualquer condição de tratamento, tempo, temperatura ou concentração de enzima.

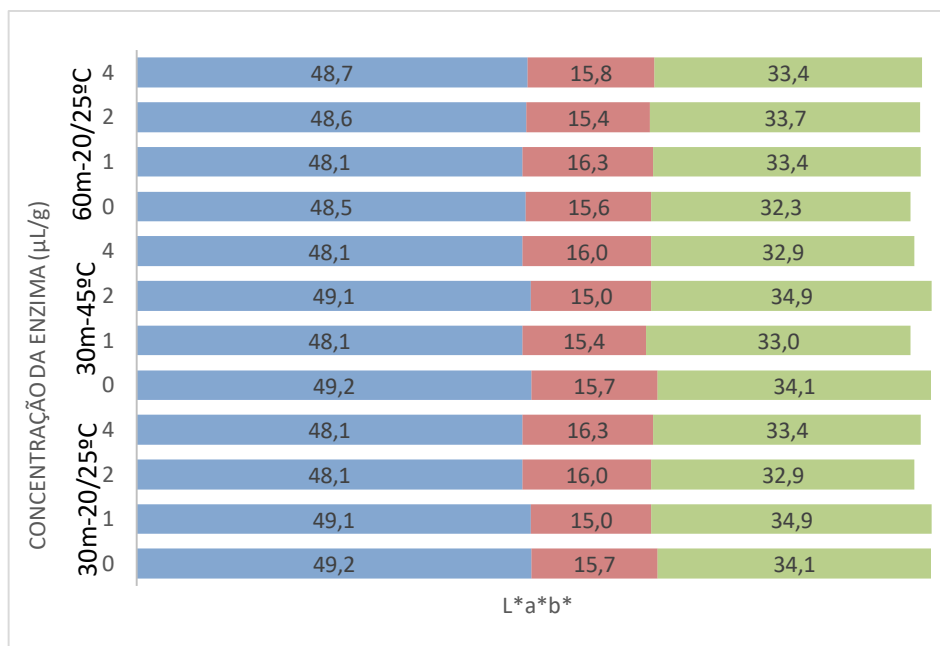


Figura 10- Cor na polpa de 1ª extração com aplicação da Viscozyme® L

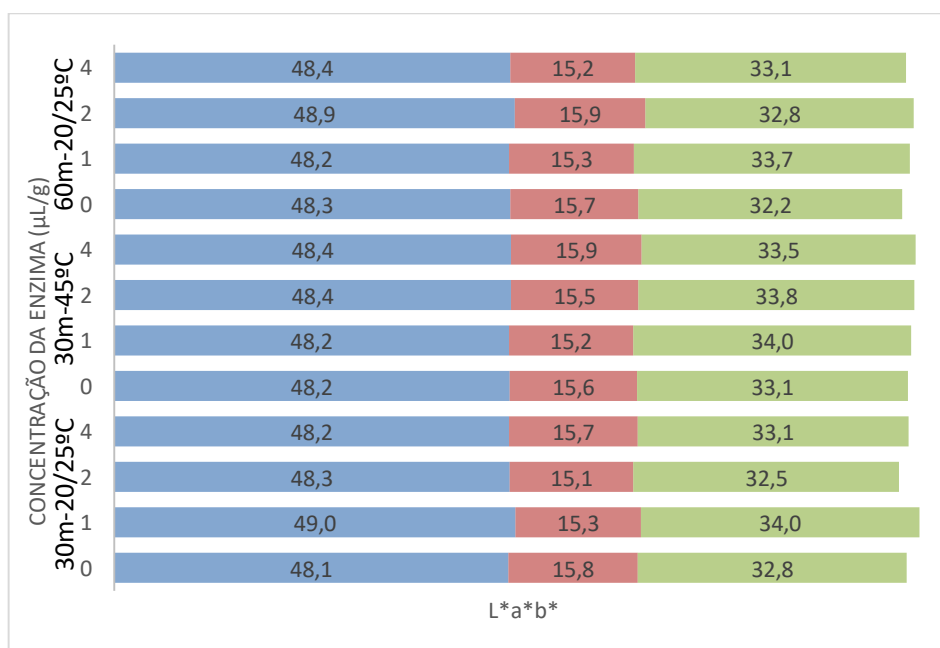


Figura 11- Cor na polpa de 1ª extração com aplicação da Pectinex®

Desta forma, apesar das polpas produzidas com auxílio destas enzimas manifestarem menor viscosidade, por exemplo, mantêm algumas das características iniciais do fruto, como é o caso da cor. Esta evidência associada ao aumento do °Brix e do rendimento de extração tornam a aplicação de enzimas ainda mais promissora na transformação deste fruto em polpas.

4.2.5. pH e acidez titulável da polpa de 1ª extração

A polpa de 1ª extração foi ainda caracterizada pelo pH, acidez titulável e extrato seco, como se pode verificar na tabela 5. A acidez titulável e o extrato seco das polpas extraídas com aplicação das enzimas não é alterado significativamente em relação aos controlos. O pH da polpas apresenta um decréscimo, tanto maior quanto maior a concentração de enzima utilizada, na maioria dos casos significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o valor do respetivo controlo nas mesmas condições de tratamento (tempo e temperatura), sendo que não são verificadas diferenças significativas entre os controlos.

Tabela 5 – pH, acidez titulável e extrato seco das polpas de 1ª extração

Enzima	Tempo (min.) Temperatura (°C)	[Enzima] (μL/g)	pH	Acidez titulável (%) ⁽¹⁾	Extrato seco (%) ⁽¹⁾
Controlo	30 - 20/25	0	3,50±0,07 ^{a,b}	1,0±0,2	31,2±2,1
	30 - 45	0	3,57±0,07 ^a	1,0±0,2	27,1±2,1
	60 - 20/25	0	3,56±0,07 ^a	1,0±0,2	31,1±2,1
Viscozyme® L	30 - 20/25	1	3,36±0,02 ^{b,c}	1,1±0,5	25,5±1,1
		2	3,29±0,01 ^c	1,1±0,0	26,7±2,5
		4	3,28±0,02 ^c	1,1±0,3	22,5±3,6
	30 - 45	1	3,54±0,11 ^a	1,1±0,3	26,4±0,4
		2	3,39±0,02 ^{a,b,c}	1,1±0,1	26,5±0,2
		4	3,32±0,02 ^{b,c}	1,1±0,2	26,8±0,2
	60 - 20/25	1	3,38±0,01 ^{a,b,c}	1,0±0,6	28,2±0,4
		2	3,30±0,01 ^c	1,1±1,0	29,8±1,3
		4	3,28±0,01 ^c	1,2±0,8	27,5±0,1
Pectinex®	30 - 20/25	1	3,35±0,07 ^{b,c}	1,1±0,1	28,8±0,9
		2	3,30±0,02 ^c	1,1±0,1	29,3±0,1
		4	3,29±0,02 ^c	1,2±0,3	29,1±0,6
	30 - 45	1	3,33±0,11 ^{b,c}	1,1±0,3	26,4±0,5
		2	3,28±0,02 ^c	1,1±0,8	26,1±0,3
		4	3,28±0,02 ^c	1,2±0,3	26,4±0,5
	60 - 20/25	1	3,54±0,11 ^a	1,1±1,0	32,6±1,2
		2	3,39±0,02 ^{a,b,c}	1,1±0,3	33,1±1,1
		4	3,32±0,02 ^{b,c}	1,2±0,6	31,8±0,5

^{a,b,c} diferentes letras na mesma coluna significam tratamentos com diferenças significativas (p<0,05); ⁽¹⁾ Sem diferenças significativas (p>0,05).

4.3. Caracterização físico-química da polpa de 2ª extração (extraída após lavagem do bagaço resultante da 1ª extração)

4.3.1. °Brix

Quanto ao °Brix das polpas obtidas após lavagem do bagaço obtido na primeira extração, ele é obviamente inferior ao obtido nas polpas da primeira extração motivado pela adição de água, na razão de 1/3 da massa de bagaço obtido após a 1ª extração. Ainda assim, quer nos controlos quer para qualquer um dos tratamentos enzimáticos, o °Brix obtido situa-se entre 14,8 (Pectinex®, Figura 13) e 16,1 (Viscozyme® L, Figura 12). Este produto proporciona assim características bastante apreciáveis em termos de sólidos solúveis, muito superiores ao verificados em frutos comumente utilizados na indústria alimentar como a laranja (11,8 °Brix), a maçã (11,5 °Brix), pêra (12 °Brix), pêssego (10,5 °Brix) ou ananás (12,8 °Brix) (Barrett *et al.*, 2004). Tal significa que o rendimento de extração de polpa de medronho (e de sólidos solúveis) poderá ser otimizado com a lavagem do bagaço proporcionando 2 tipos de produtos distintos, passíveis de utilização, *per si* ou em mistura, após tratamentos convenientes de conservação.

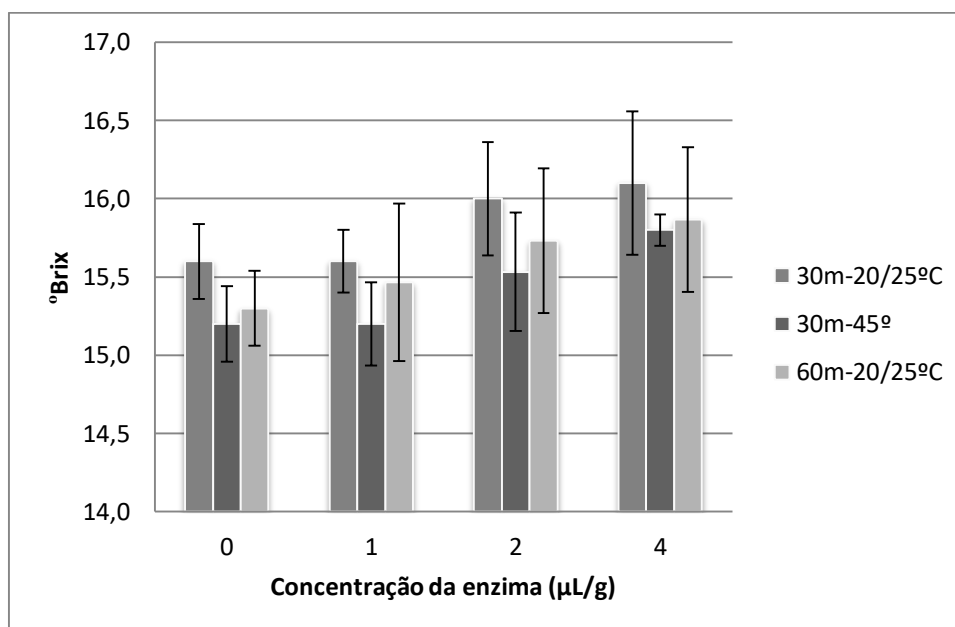


Figura 12 – °Brix na polpa de 2ª extração com aplicação da Viscozyme® L

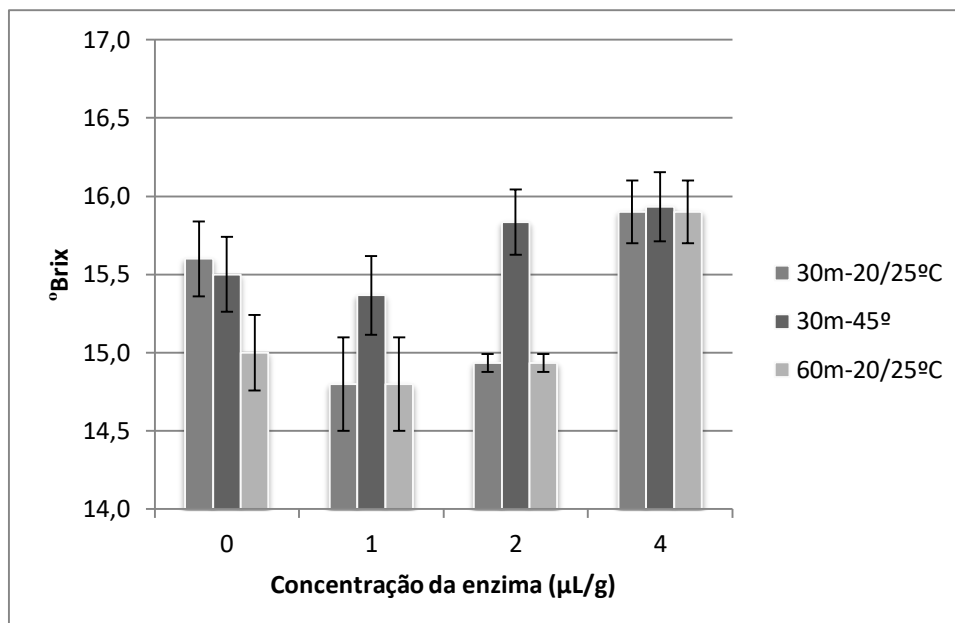


Figura 13 - °Brix na polpa de 2ª extração com aplicação da Pectinex®

4.3.2. Cor

A cor da 2ª polpa extraída após lavagem do bagaço submetido aos tratamentos enzimáticos da Viscozyme® L (Figura 14) e da Pectinex® (Figura 15), apresenta diferenças evidentes quando comparada com a cor da 2ª polpa extraída após lavagem do bagaço tratado sem adição de enzimas (controles da 2ª extração). Aquelas apresentam cor mais escura (com valores de luminosidade (L^*) mais baixos, mas também e essencialmente com contribuição do vermelho (a^*) e do amarelo (b^*) até 50% e 88% inferiores, respetivamente. Isto traduz-se em polpas, para além de mais escuras, com um tom predominante mais avermelhado em comparação com mais cor de laranja-amarelados no controlos da 2ª extração. A cor das polpas de 2ª extração provenientes do tratamento enzimático não traduzem diferenças evidentes entre si.

Se comparadas as cores dos controlos (Figuras 10 e/ou 11) com as dos controlos da 2ª extração (Figuras 14 e/ou 15), polpa extraída antes e depois da lavagem, respetivamente, e sem o efeito da ação de qualquer uma das enzimas estudadas, verifica-se também, no segundo face ao primeiro, uma diluição de L^* , dos valores de a^* em cerca de 59% e, essencialmente, de b^* com perda de cerca de 73%. Tudo isto se traduz numa polpa de 2ª extração mais escura, ainda alaranjada mas com tom tendencialmente mais vermelho face a cor da polpa de primeira extração.

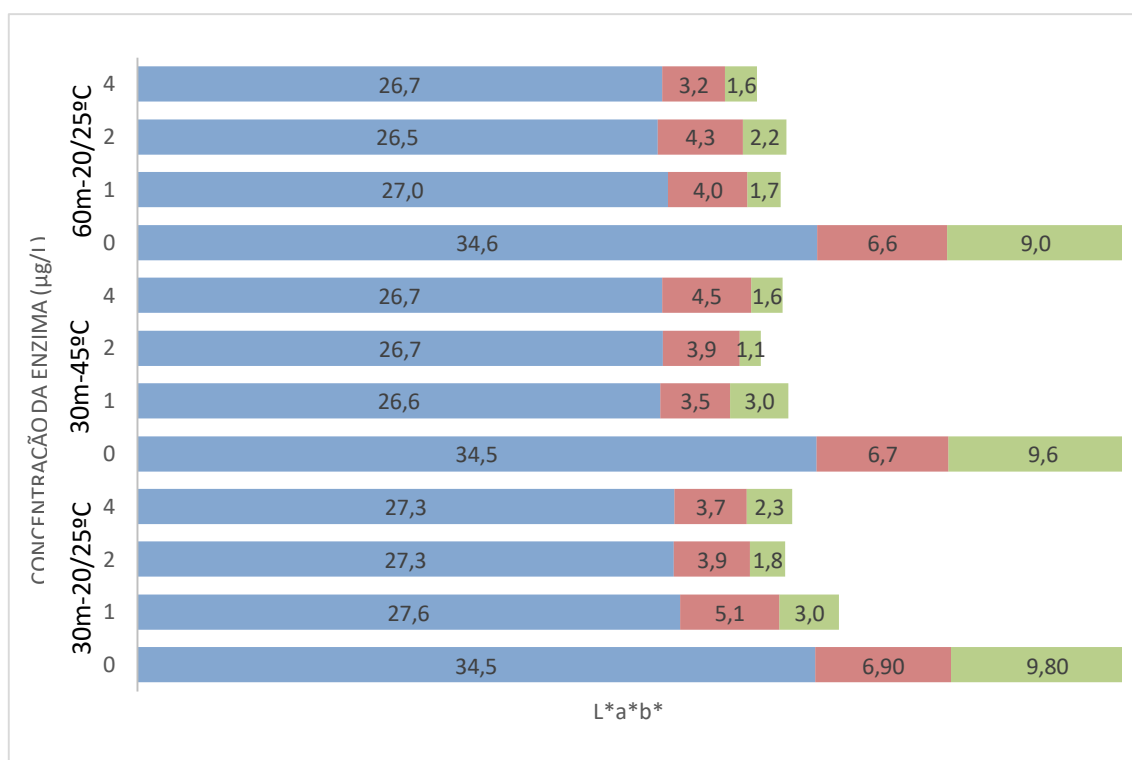


Figura 14 – Cor na polpa de 2ª extração com aplicação da Viscozyme® L

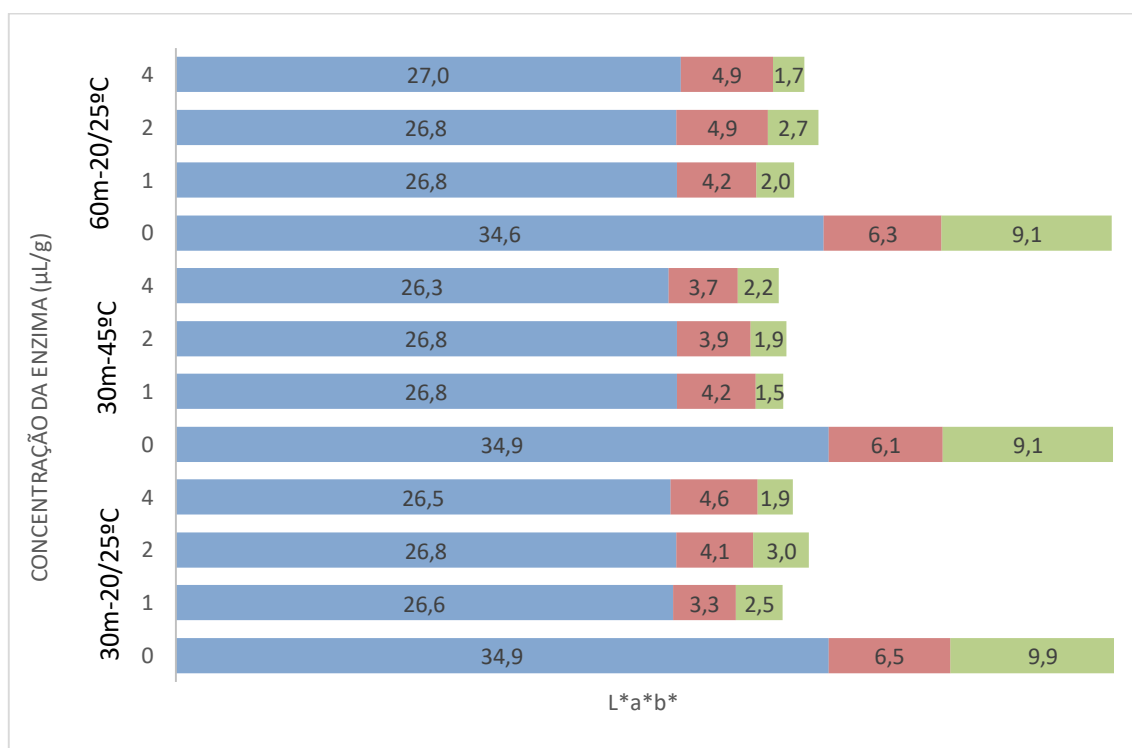


Figura 15 – Cor na polpa de 2ª extração com aplicação da Pectinex®

4.3.3. pH e acidez titulável da polpa de 2ª extração

A polpa de 2ª extração foi ainda caracterizada quanto ao pH e acidez titulável, como se pode verificar na tabela 6. Os valores de pH, acidez titulável, após aplicação das enzimas não são alterados significativamente em relação aos valores do controlo da 2ª extração. À semelhança da polpa de primeira extração, pode-se afirmar que nenhuma das enzimas afeta estes parâmetros de caracterização da polpa de 2ª extração.

Tabela 6 – pH e acidez titulável da polpa de 2ª extração

Enzima	Tempo (min.) Temperatura (°C)	[Enzima] uL/g	pH	Acidez titulável (%) ⁽¹⁾
Controlo 2	30-20/25	0	3,40±0,04 ^a	0,6±0,1
	30-45	0	3,35±0,04 ^{a,b}	0,6±0,1
	60-20/25	0	3,39±0,04 ^{a,b}	0,5±0,1
Viscozyme® L	30 - 20/25	1	3,30±0,04 ^{a,b}	0,6±0,1
		2	3,40±0,05 ^{a,b}	0,6±0,1
		4	3,30±0,07 ^{a,b}	0,6±0,2
	30 - 45	1	3,30±0,02 ^{a,b}	0,6±0,1
		2	3,30±0,01 ^{a,b}	0,6±0,1
		4	3,30±0,01 ^{a,b}	0,6±0,1
	60 - 20/25	1	3,30±0,05 ^{a,b}	0,6±0,0
		2	3,30±0,02 ^{a,b}	0,6±0,0
		4	3,30±0,03 ^{a,b}	0,6±0,0
Pectinex®	30 - 20/25	1	3,40±0,02 ^{a,b}	0,6±0,1
		2	3,30±0,02 ^{a,b}	0,6±0,01
		4	3,30±0,01 ^{a,b}	0,6±0,08
	30 - 45	1	3,30±0,02 ^{a,b}	0,6±0,11
		2	3,30±0,01 ^{a,b}	0,6±0,08
		4	3,30±0,06 ^b	0,6±0,20
	60 - 20/25	1	3,30±0,05 ^{a,b}	0,6±0,20
		2	3,30±0,02 ^{a,b}	0,6±0,06
		4	3,30±0,03 ^{a,b}	0,6±0,03

^{a,b} diferentes letras na mesma colunas significam tratamentos com diferenças significativas (p<0,05); ⁽¹⁾ Sem diferenças significativas (p>0,05),

5. Conclusões e perspectivas futuras

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o objetivo inicial foi alcançado. Conseguiu-se um aumento do rendimento da extração de polpa de medronho a partir de medronho triturado e submetido a tratamento enzimático pelas Viscozyme® L e Pectinex® com redução considerável da viscosidade das polpas produzidas por esta metodologia.

Conclui-se que, para o aumento do rendimento da extração da polpa de medronho, a enzima com melhor *performance* foi a Pectinex® nas condições de 2 µL/g incubada durante 30 minutos a 45 °C, com $54,9 \pm 1,1\%$. Em qualquer das condições a que foi sujeito o medronho com esta enzima, os rendimentos de extração de polpa foram sempre superiores a 50%. Nas condições estudadas, a aplicação Viscozyme® L não demonstrou ser eficiente no aumento do rendimento de extração da polpa de medronho.

Quanto à viscosidade aparente das polpas extraídas, conclui-se ainda que a aplicação da Viscozyme® L motiva polpas com menor viscosidade ($0,88 \pm 0,33$ Pa.s), nas condições de 4 µL/g incubada durante 30 minutos a 45 °C, quando comparada com polpas provenientes da ação da Pectinex® ($1,19 \pm 0,22$ Pa.s para as mesmas condições). Salienta-se que a viscosidade aparente da polpa de medronho extraída sem ação daquelas enzimas, nas mesmas condições de tratamento (controlo), foi de $8,90 \pm 0,20$ Pa.s, bastante superior ao anteriormente apresentado.

A aplicação das enzimas Viscozyme® L e Pectinex® proporcionou também um aumento do °Brix das polpas extraídas, em concordância com a sua ação catalítica sobre os hidratos de carbono mais complexos em açúcares de baixo peso molecular com influência direta no índice de refração daqueles produtos. A polpa de medronho alcançou os 27 °Brix quando aplicada a Pectinex® nas condições de 4 µL/g incubada durante 30 minutos a 20/25 °C.

Em relação a outras características das polpas de medronho de 1º extração, tais como, cor, pH, acidez titulável e extrato seco, não houve alterações significativas quando aplicadas ou não estas duas enzimas.

No que à polpa de 2ª extração diz respeito, ela caracteriza-se essencialmente por uma diminuição do °Brix motivado pela lavagem do bagaço, ainda que mais elevado se tratado enzimaticamente, e de cor significativamente mais escura e mais avermelhada.

O °Brix das polpas de 2ª extração é ainda assim muito superior ao °Brix apresentado por muitos frutos com relevância na indústria dos hortofrutícolas. Tal justifica a utilização desta metodologia na extração de polpa de medronho, aumentando o seu rendimento de extração (e de sólidos solúveis) proporcionando 2 tipos de produtos distintos, com potencial de utilização, *per si* ou em mistura e após tratamentos convenientes de conservação, nos mais variados sectores da indústria alimentar.

O medronheiro por várias razões não é devidamente explorado em termos agrícolas, mas tem vindo a ganhar popularidade ao longo dos anos com o desenvolvimento e aparecimento no mercado de novos e inovadores produtos à base de medronho. Os resultados deste estudo, ainda que preliminares e a necessitar de confirmação em estudos posteriores, permitem desde já encarar com elevada expectativa a possibilidade da utilização rentável da aplicação de enzimas carboidrases do tipo Viscozyme® L e Pectinex® no processo de extração de polpa de medronho e aumentar a variedade de produtos derivados do medronho com mais-valia para esta fileira e para indústria alimentar.

Referências bibliográficas

- Abreu, M. M., Godinho, B., & Magalhães, M. C. F. (2014). Risk assessment of *Arbutus Unedo* L. fruits from plants growing on contaminated soils in the Panasqueira mine area, Portugal. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 744-757.
- Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., & Leitão, M. C. A. (2001). The arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 27-35.
- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claissse, A., Duchiron, F. (2011) “Yeasts: Na attractive source of pectinases – From gene expression to potential applications: A review” *Process Biochemistry* 46, pp. 1525–1537
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M., Serra, J. (1998) "Industrial applications of pectic enzymes: a review", *Process Biochemistry* 33, I, pp. 21–28
- Anastácio, J. (2014) Contributo para o estudo do medronheiro (*Arbutus unedo* L.): caracterização morfológica de clones e fisiologia póscolheita do fruto. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Agronómica. Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. Lisboa
- Barrett, D.M., Somogyi, L., Rasmuswamy, H., *Processing fruits* (2004) – Science and Technology – 2nd ed.. CRC Press. ISBN: 0-8493-1478, pp. 411
- Barnes, H.A, Hutton, J.F., Waters, K. (1989) “An Introduction to Rheology”, Elsevier, Amsterdam, pp. 125-126.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* 120: 247-254
- Begerow (2006), Technical Information – Enzymation Pectinex ® Mash. E. Begerow GmbH&Co. Alemanha. pp 1-2
- Bianchi, F., Careri, M., & Musci, M. (2005). Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus Unedo* L.) honey:

Characterization of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food chemistry*, 89(4), 527-532.

Cavaco, T. (2007). Caracterização química e bioquímica dos frutos de *Arbutus unedo* L. e de *Rubus fruticosus* Agg. - Contribuição para a sua valorização. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais - Universidade do Algarve. Faro.

Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., Gama, M. (2003) “Engenharia Enzimática” LIDEL - Edições Técnicas, Lda. Lisboa, pp. 1–57

Cela, P. G., Viñas, J. I. G., & Gamarra, R. G. (2003). Árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Madrid.

Celikel, G. et al (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 115-119.

Doraiswamy, D. (2002). The Origins of Rheology: A Short Historical Excursion, *Rheol Bull*, 71 (1), 1-9.

Dias, V. (2014). Estruturas secretoras em Medronheiro (*Arbutus unedo* L.): caracterização morfológica, estrutural e histoquímica e avaliação da atividade proteásica da secreção. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade de Coimbra.

Ertekin, M., & Kirdar, E. (2010). Breaking Seed Dormancy of Strawberry Tree (*Arbutus unedo*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(1), 57-60.

Fawote, O. B., Odunfa, S. A. (2003) “Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 52, pp. 223–227

Fernández-González, M., Úbeda, J. F, Vasudevan, T. G., Otero, R. R. C., Biones, A. I. (2004) “Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains” *FEMS Microbiology Letters* 237, pp. 261–266

Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A. P., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural product research*, 26(16), 1558-1560.

- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2(2), 214-229.
- GFU: Global Facilitation Unit for Underutilized Species. <http://www.underutilized-species.org> (Acedido a 15/06/2017).
- Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A., & Rego, F. (2005). Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana*, 13(1), 1-34.
- Gomes, F., Simões, M., Lopes, M. L., & Canhoto, J. M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New biotechnology*, 27(6), 882-892.
- Gomes, F., Gama, J., Figueiredo, P., Santos, A. R., & João, C. (2014). Clonagem de plantas selecionadas de medronheiro e a sua avaliação de campo. Disponível em <http://www.greenclon.pt/artigofgomesalgarve.pdf> (acedido a 13/07/2017).
- Gomes, F., & Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(1), 72-82.
- Goodwin, J.W., Hughes, R.W., (2008) “Rheology for Chemists: An Introduction”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, ISBN: 0854048391
- Gratani, L., & Ghia, E. (2002). Adaptative strategy at the leaf level of *Arbutus unedo* L. to cope with Mediterranean climate. *Flora*, 197, 275-284.
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M., Miguel, M. G., & Antunes, M. D. (2013). The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. *Scientia Horticulturae*, 159, 96-102.
- Hileman, L. C., Vasey, M. C., & Thomas Parker, V. (2001). Phylogeny and biogeography of the *Arbutioideae* (*Ericaceae*): implications for the Madrean-Tethyan hypothesis. *Systematic Botany*, 26(1), 131-143.
- Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R. (2005) “Microbial pectinolytic enzymes: A review” *Process Biochemistry* 40, pp. 2931–2944

- Krajewska, B. (2004) “Applicantion of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review” *Enzyme and Microbial Technology* 35, pp. 126–139
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) “Applications of pectinases in the comercial sector: a review” *Bioresource Technology* 77, pp. 215–227
- Lagarto, V., Gomes, F., Franco, J., Oliveira, F. (2013) Estudo de mercado sobre as potencialidades do medronho na região centro. *Agrotec – revista técnica científica agrícola* 6: 78-81
- Lancellotti, E., Iotti, M., Zambonelli, A., & Franceschini, A. (2014). Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 1-6.
- Lei, Z., Bi, S., Yang, H. (2007a) “Chitosan-tethered the sílica particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization” *Food Chemistry* 104, pp. 577–584
- Lopes, L., Sá, O., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2012). Genetic diversity of Portuguese *Arbutus Unedo L.* populations using leaf traits and molecular markers: An approach for conservation purposes. *Scientia Horticulturae*, 142, 57-67.
- Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2012). *Arbutus Unedo L.* leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 473-478.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandes-Lafuente, R. (2007) “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques” *Enzyme and Microbial Technology* 40, pp. 145 –1463
- Mereti, M., Grigoriadou, K., & Nanos, G. D. (2002). Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus Unedo L.* *Scientia horticulturae*, 93(2), 143-148.
- Mendes, L., Freitas, V., Baptista P., Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2285-2291.
- Miletić, N., Nastasović, A., Loos, K. (2012) “Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilites, advantages, applicantions” *Bioresource Technology* 115, pp. 126–135

- Molina, M., Pardo-De-Santayana, M., Aceituno, L., Morales, R., & Tardío, J. (2011). Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry*, cpr031.
- Morales, P., Ferreira, I. C., Carvalho, A. M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M., Cámara, M., & Tardío, J. (2013). Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(2), 176-185.
- Netto, I. (s/d). *Análise de generos alimenticios – metodos fisicos e quimicos*. Lisboa. Portugal. pp 276-283
- Noronha, J. (2001) *Metabolitos secundários do fruto de Arbutus unedo L. (Medronho)*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Química. Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa
- NovoNordisk (2007) *Product Sheet – Viscozyme L*. Novo Nordisk BioChem, EUA. pp 1-2
- NovoNordisk (1993), *Product Sheet – Viscozyme L*. Novo Nordisk BioChem, EUA. pp 1-2
- Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011a). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(5), 1401-1407.
- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2009). Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1507-1511.
- Oliveira, I., Guedes de Pinho, P., Malheiro, R., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2011b). Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. *Food Chemistry*, 128(3), 667-673.
- Orak, H., Aktas, T., Yagar, H., Isbilir, S., Ekinci, N., Sahin, F. (2013) Antioxidant activity, some nutritional and colour properties of vacuum dried strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Acta Scientiarum Polonorum, Technol. Aliment.* 10: 327-338

- Özcan, M. & Haciseferoğullari, H. (2007) The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering* 78:1022–1028
- Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., Del Castillo, M. D., Cano, M. P., & de Pascual-Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 273-281.
- Pedro, J. G. (1994). Portugal Atlas do Ambiente. Notícia Explicativa II.6. Carta da distribuição de figueira e medronheiro. Lisboa: Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, pp.39.
- Pereira, J. A. N. (2010) “Estudo da estabilidade, actividade e cinética enzimática da lacase em líquidos iónicos.” – Dissertação apresentada com vista à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química – Universidade de Aveiro.
- Pimpão, R.C., Dew, T., Oliveira, P.B., Williamson, G., Ferreira, R.B., Santos, C.N. (2013) Analysis of Phenolic Compounds in Portuguese Wild and Commercial Berries after Multienzyme Hydrolysis. *Journal of Agriculture of Food Chemistry* 61: 4053-4062
- Plaza, L., Duvetter, T., Van der Plancken, I., Meersman, F., Van Loey, A., Hendrickx, M., (2008) "Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmethylesterase", *Food Chemistry* 111, pp. 912–920
- Prada, M. A. & Arizpe, D. (2008). Riparian tree and shrub propagation handbook. Valência pp. 27-29, ISBN 978-84-482-4965-6.
- Quevedo, L., Arnan, X., & Rodrigo, A. (2013). Selective thinning of *Arbutus unedo* coppices following fire: Effects on growth at the individual and plot level. *Forest Ecology and Management*, 292, 56-63.
- Rosa, A., Tuberoso, C. I. G., Atzeri, A., Melis, M. P., Bifulco, E., & Dessì, M. A. (2011). Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chemistry*, 129(3), 1045-1053.

- Rotondi, A., Rossi, F., Asunis, C., Cesaraccio, C. (2003). Leaf xeromorphic adaptations of some plants of a coastal Mediterranean macchia ecosystem. *Journal of Mediterranean Ecology*, 4(3-4), 25-35.
- Ruiz-Rodríguez, B-M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M-C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M., Tardío, J. (2011) Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International* 44: 1244 –1253
- Sá, O., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2011). Optimization of DNA Extraction for RAPD and ISSR Analysis of *Arbutus unedo* L. Leaves. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 4156-4164.
- Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47(1), 45-50.
- Serçe, S., Özgen, M., Torun, A., Ercişli, S. (2010) Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. Ericaceae) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 619–623
- Scott. Blair, G. W.; Hening, J. C.; Wagstaff, A.; The Flow of Cream through Narrow Glass Tubes, *J. Phys. Chem.* 1939, 43, 853–864.
- Silva, J. (2007) *Árvores e Florestas de Portugal Vol. V, Floresta e Sociedade*. Público pp 143-155 ISBN 978-989-619-102-3
- Sinha, N. K., Sidhu J. S., Barta, J., Wu, J.S.B., Cano, M.P. (2012) *Handbook of fruits and fruit processing*. EUA. Wiley-Blackweel, pp. 371-379. ISBN 978-0-8138-0894-9
- Sorensen, P. D. (1987). *Arbutus tessellata* (Ericaceae), new from Mexico. *New York Botanical Garden*, 39(2), 263-267.
- Statsoft, Inc. - Statistica (Electronic Statistics Textbook.), Tulsa, OK, 2013

- teffe, J.F., “Rheological Methods in Food Processing Engineering”, Freeman Press, East Lansing, 1996, pp.173-176
- Sulusoglu, M., Cavusoglu, A. e Erkal, S. (2011) *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree) selection in Turkey Samanli mountain locations. Journal of Medicinal Plants Research 5: 3545-3551
- Takrouni, M. M., Ben El Haj Ali, I., Messaoued, C., & Boussaid, M. (2012). Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. Scientia Horticulturae, 146, 92-98.
- Tenhunen, J. D., Lange, O. L., Jahner, D. (1982). The control by atmospheric factors and water stress of midday stomatal closure in *Arbutus unedo* growing in a natural macchia. Oecologia, 55, 165-169.
- Torres, J. A., Valle, F., Pinto, C., Garcia-Fuentes, A., Salazar, C., & Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. Plant Ecology, 160(2), 207-223.
- Vasques, A., Chirino, E., Vilagrosa, A., Vallejo, V. R., & Keizer, J. J. (2013). The role of seed provenance in the early development of *Arbutus unedo* seedlings under contrasting watering conditions. Environmental and Experimental Botany, 96, 11-19.
- Ziyyat, A., & Boussairi, E. H. (1998). Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. Phytotherapy Research, 12(2), 110-113.
- Zizzo, G., Aprile, S., La Mantia, A. & Lazzara, S., (2010). Investigations on the Biodiversity of the Strawberry Tree (*Arbutus unedo*) in Sicily (Southern Italy) as Resource for the Floricultural Sector. VII International Symposium, New Floriculture Crops, Buenos Aires, Argentina. Pp 1-15.

Anexos

Anexo I

Viscozyme® L / Pectinex®

Procedimento:

1. Descongelar a amostra no frigorífico;
2. Pesar os copos e identificá-los;
3. Pesar as redes e identificá-las;
4. Colocar 50 g de amostra no copo;
5. Realizar V1, V2 e V4 em triplicado;
 - Controlo – Sem enzima (0µL/g)
 - V1 - Concentração indicada pelo fornecedor (1µL/g)
 - V2 – 2 vezes a V1 (2µL/g)
 - V4 – 4 vezes a V1 (4µL/g)
6. Aplicar a enzima nas concentrações indicadas;
7. Colocar as amostras na estufa na temperatura (20-25 °C ou 45 °C) e tempo pretendidos (30 ou 60 minutos);
8. Retirar as amostras da estufa e colocá-las no micro-ondas durante 15 segundos e passar imediatamente por um banho gelado;
9. Registrar os valores do peso do sumo/polpa extraído para cálculo de rendimento de extração;
10. Registrar o peso da rede com bagaço;
11. Realizar análises reológicas ao sumo/polpa extraídos;
12. Realizar análises ao °Brix, pH, cor, acidez titulável e extrato seco do sumo/polpa extraído.
13. Realizar uma segunda lavagem ao bagaço com água equivalente a 33% do seu peso;
14. Registrar os valores de °Brix, pH, cor, e acidez titulável do sumo de 2ª lavagem e do bagaço;
15. Guardar as amostras em congelação de V1, V2 e V4 e do bagaço para realização posterior de análises do poder antioxidante.

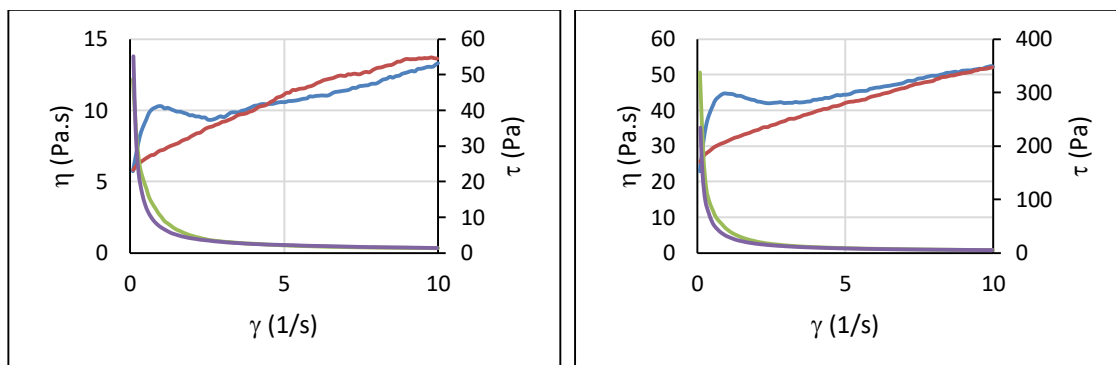
Anexo II

1. 60 minutos – 20-25 °C

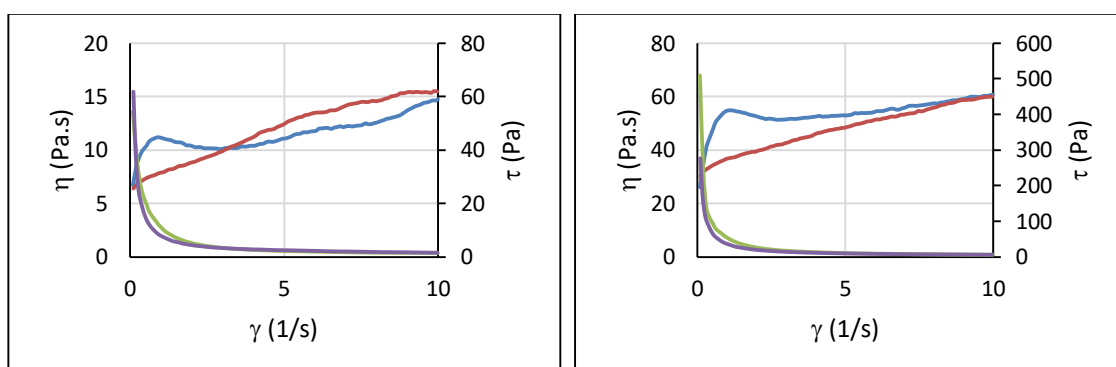
Viscozyme

Pectinex

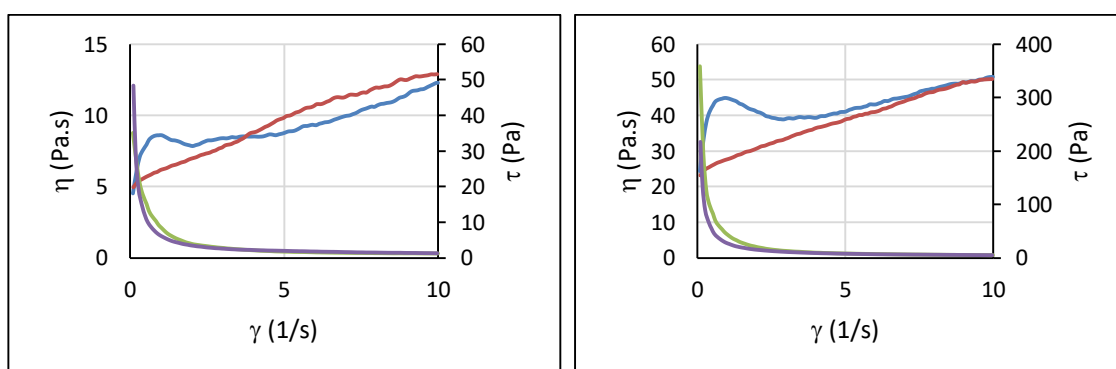
1 $\mu\text{L/g}$



2 $\mu\text{L/g}$



4 $\mu\text{L/g}$



Legenda:

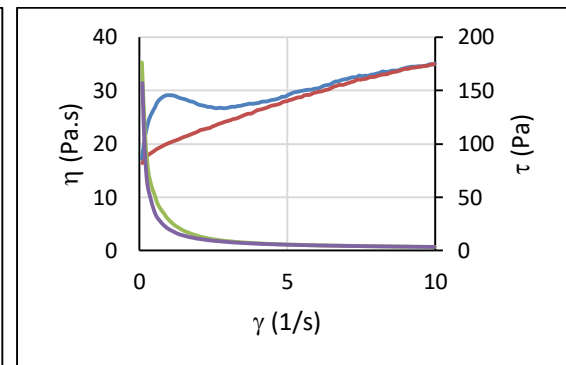
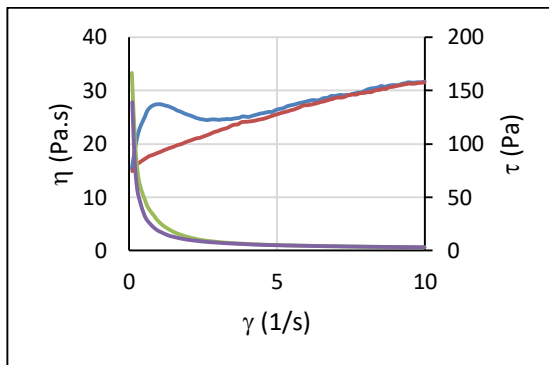
— ascendente — descendente
— ascendente — descendente

2. 30 minutos – 20-25 °C

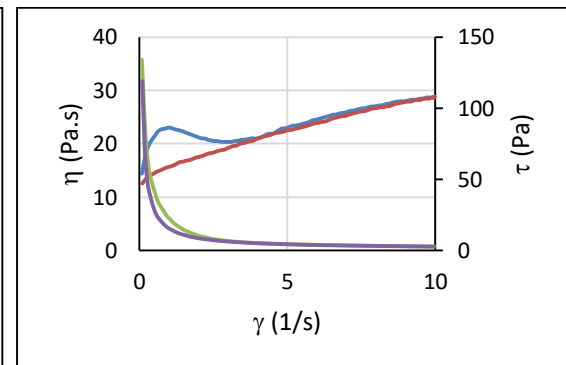
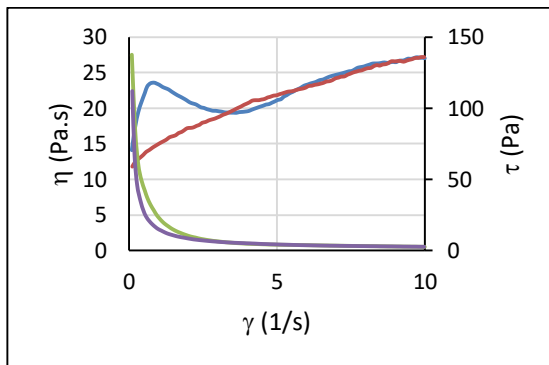
Viscozyme

Pectinex

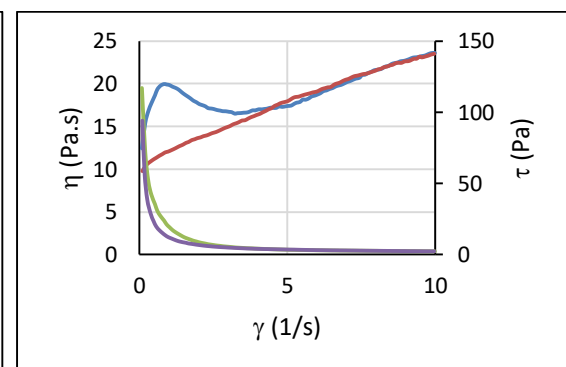
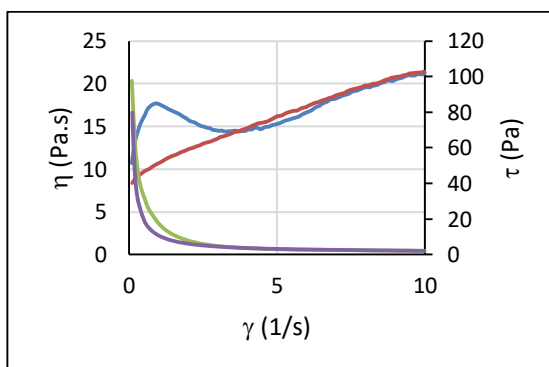
1 $\mu\text{L/g}$



2 $\mu\text{L/g}$



4 $\mu\text{L/g}$



Legenda:

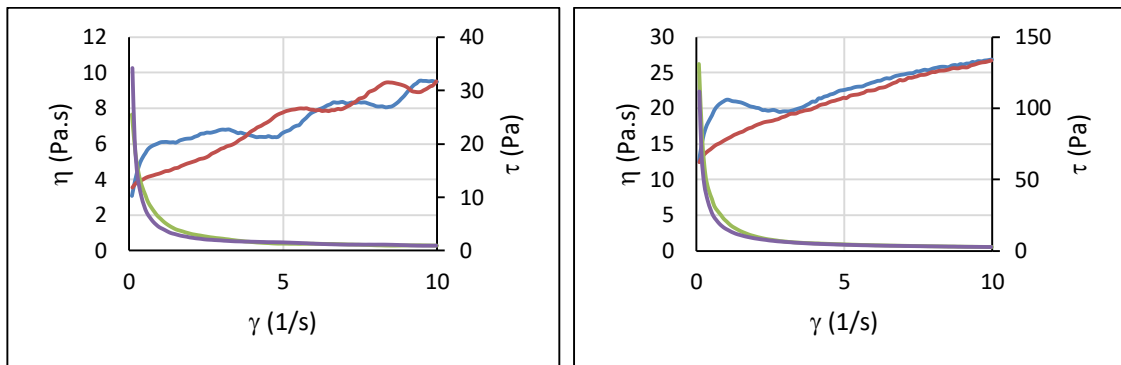
— ascendente — descendente
— ascendente — descendente

3. 30 minutos – 45 °C

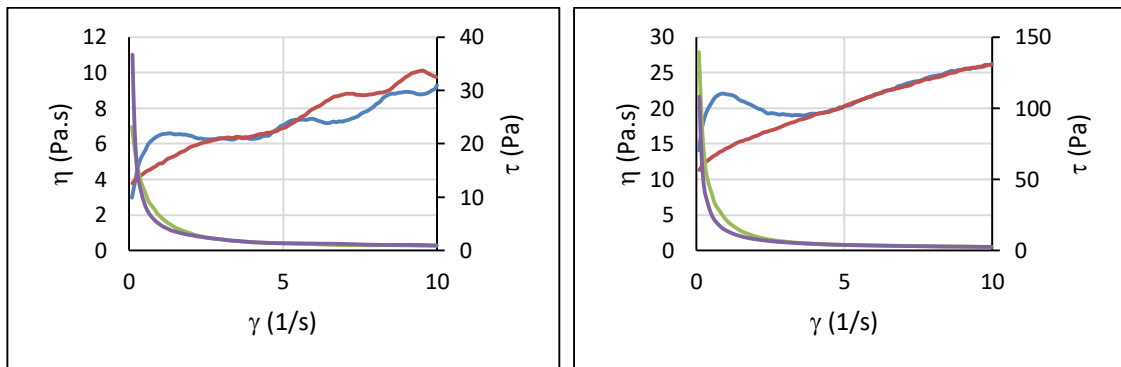
Viscozyme

Pectinex

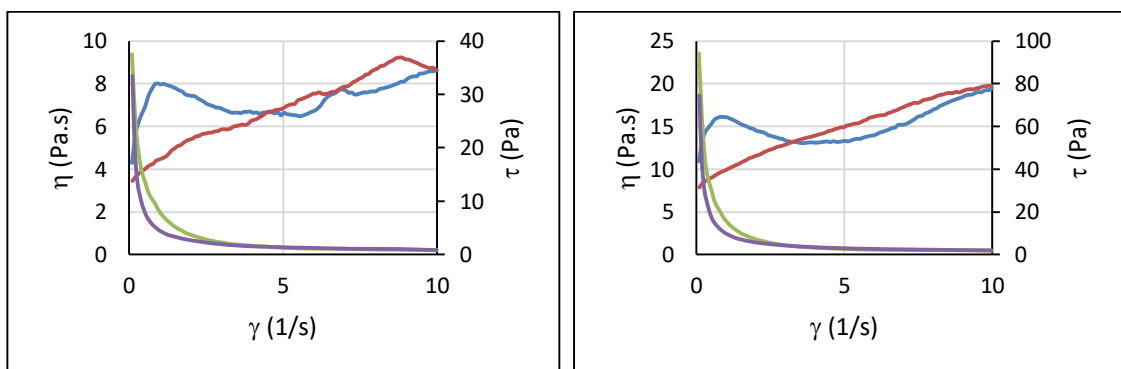
1 $\mu\text{L/g}$



2 $\mu\text{L/g}$



4 $\mu\text{L/g}$



Legenda:

— ascendente — descendente
— ascendente — descendente